

# ІМУНОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ ДІТЕЙ З ПРОГНОСТИЧНО НЕСПРИЯТЛИВИМИ ФОРМАМИ ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕНЬ М'ЯКИХ ТКАНИН В ДИНАМІЦІ КОМПЛЕКСНОГО ЛІКУВАННЯ



К.С. Шуміліна, Ю.Я. Гріневич,  
С.М. Кукушкіна, Г.Д. Льон,  
Ф.В. Фільчаков, Г.І.Климнюк,  
Е.В.Шайда

Адреса:

Шуміліна Катерина Станіславівна  
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43  
Тел.: 0 (44) 259-01-84, 0 (50) 910-41-09

**Ключові слова:** діти із злоякісними новоутвореннями м'яких тканин, імунологічний моніторинг, імунофенотип лімфоцитів, активційні маркери лімфоцитів.

Досліджено стан імунної системи у 42 дітей із злоякісними новоутвореннями м'яких тканин в динаміці лікування: 32 хворих із вперше встановленим діагнозом та 10 пацієнтів, що закінчили лікування і знаходяться в стані ремісії. В імунній системі обстежених дітей відмічають порушення як в клітинній, так і в гуморальній ланках, що проявляється зменшенням кількості CD3<sup>+</sup>-, CD20<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-лімфоцитів в циркуляції на тлі зменшення загальної кількості лімфоцитів в периферичній крові, а також дисімуноглобулінемією. Проведення інтенсивної поліхіміотерапії поглиблює порушення в імунній системі цих дітей, які не відновлюються через 1–2 роки після закінчення лікування. У дітей, що знаходяться в стані ремісії, виявляють менші порушення клітинної ланки імунної системи безпосередньо після лікування; через 12 міс після закінчення лікування всі досліджені показники відновлюються до рівня у практично здорових дітей. Виявлені порушення в імунній системі дітей обґрунтовують необхідність імунореабілітації, яка може покращити ефективність їх лікування з подовженням безрецидивного періоду та збільшенням виживаності.

## ВСТУП

Сучасні протоколи інтенсивного лікування значно знизили смертність дітей від онкологічних захворювань із досягненням рівня 5-річної виживаності до 70%. Разом з тим, паралельно з успіхами онкопедіатрії збільшується проблема пізніх ускладнень лікування, що проявляються порушенням функціонування основних систем життєзабезпечення організму, і, зокрема, імунної системи [13–15]. Враховуючи нові інтенсивні програми лікування і сучасні методики імунодіагностики, актуальним є визначення ступеня імунологічних порушень як на етапах лікування, так і упродовж тривалого часу після його закінчення.

Сьогодні велика увага приділяється дослідженню активаційної дисфункції імунної системи в онкологічних хворих у зв'язку з розробкою й впровадженням більш ефективних методів лікування. Перспективним напрямком дослідження є визначення вмісту активованих лімфоцитів (з антигенами HLA-DR, CD25 або CD95) у периферичній крові онкологічних хворих.

Лімфоцити, які експресують HLA-DR- та CD25-антигени — це позитивно активовані лімфоцити. Така активація клітинної ланки призводить до реалізації

її ефекторних функцій — антигенспецифічної цитотоксичності, стимуляції антитілоутворення та продукування цитокинів [2]. Кількість активованих Т-лімфоцитів збільшується при запальному процесі відповідно до ступеня його вираженості. Торпідний перебіг хронічних захворювань супроводжується зменшенням кількості активованих Т-лімфоцитів, що може свідчити про пригнічення реактивності імунної системи [11]. За даними деяких авторів [7, 16], зниження вмісту активованих Т-лімфоцитів у крові онкологічних хворих є несприятливою прогностичною ознакою. Винятком є регуляторні Т-клітини, які також експресують CD25-антиген, але при цьому здатні пригнічувати розвиток протипухлинної імунної відповіді [5, 12, 17].

Вміст CD95<sup>+</sup>-лімфоцитів відображає рівень негативної активації й апоптозу лімфоцитів. Збільшення кількості клітин, які експресують цей маркер, корелює зі ступенем тяжкості запального процесу та імунодефіциту. Зниження експресії CD95-антигену на лімфоцитах характерно для лімфопроліферативних процесів [4, 7]. Ймовірно, порушення процесів регуляції позитивної й негативної активації може бути складовою іму-

нопатогенезу злоякісних захворювань, тому визначення вмісту активованих лімфоцитів у крові онкологічних хворих у динаміці протипухлинного лікування є важливою складовою імуномоніторингу таких хворих [10, 18].

Рівень сироваткових імуноглобулінів основних класів (А, М, G) та циркулюючих імунних комплексів відображає функціональний стан гуморальної ланки імунної системи. Визначення даних показників у дітей допоможе оцінити, в першу чергу, можливості протиінфекційного імунного захисту організму.

Метою роботи було дослідити стан імунної системи дітей з прогностично несприятливими формами злоякісних новоутворень м'яких тканин (ЗНМТ) в динаміці комплексного лікування.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ**

За період 2007–2009 рр. в науково-дослідній лабораторії клінічної імунології Національного інституту раку проведено дослідження стану імунної системи у 42 дітей, хворих на ЗНМТ, віком від 3 міс до 18 років. Проведення досліджень було схвалено локальною комісією з питань етики Національного інституту раку МОЗ України.

За віком пацієнти були розподілені на групи — молодша (0–6 років) та старша (7–18 років); за перебігом хвороби — первинні хворі (хворі із вперше встановленим діагнозом, 32 пацієнти) та хворі, що закінчили лікування і знаходяться в стані ремісії (10 пацієнтів). Первинні хворі отримували поліхіміотерапію (ПХТ) першої лінії за програмою CWS-96, ЕрSSG RMS 2005, ЕрSSG NRSTS 2005. Хворі, що закінчили лікування і перебували в стані ремісії, отримували ПХТ першої лінії за програмою CWS-96 та мали в анамнезі 4–15 курсів терапії із використанням цитостатиків

в середньо-високих дозах (режими VAIA, CEVAIA).

Імунологічне обстеження первинних хворих проводили до початку лікування (1-й етап), після етапу локального контролю (2-й етап), безпосередньо після закінчення лікування (3-й етап), через 6 міс (4-й етап), через 1 рік (5-й етап) та через 2 роки після закінчення лікування (6-й етап). Хворих в стані ремісії обстежували безпосередньо після закінчення лікування (1-й етап), через 6 міс (2-й етап), через 1 рік після закінчення лікування (3-й етап).

Імунологічні дослідження включали кількісну оцінку різних субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) методом проточної цитофлуориметрії за допомогою панелі моноклональних антитіл, мічених флуоресцеїн-5-ізотіоціанатом, до CD3-, CD4-, CD8-, CD16-, CD20-, CD95-, HLA DR-антигенів («Сорбент», Російська Федерація) згідно з методикою [8]. Моноклональні антитіла з гепаринізованою кров'ю у співвідношенні 1:5 інкубували у темряві упродовж 30 хв при температурі 20–25 °C; додавали 2 мл лізуючого розчину та витримували 10 хв при тих же умовах. Потім клітини двічі відмивали забуференим ізотонічним розчином NaCl та фіксували 1% розчином параформальдегіду. Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan («Becton Dickinson», США) з використанням програми «Cell Quest». Гейт популяції клітин встановлювали на підставі комбінації прямого та бокового світлорозсіювання. Під час обліку результатів підраховували 2000 клітин у гейті.

Імунорегуляторний індекс (IPI) визначали як співвідношення CD4/CD8.

Визначення основних класів сироваткових імуноглобулінів (Ig) А, М, G проводили за допомогою методу радіальної імунодифузії; рівня циркулюючих імунних

комплексів (ЦК) — методом селективної преципітації поліетиленгліколем 6000 [3].

Статистична обробка отриманих даних проведена із використанням Excel (MS Office 2003, XP) та програми STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США). Під час порівняння показників двох незалежних груп при нормальному розподілі значень результатів вибірки застосовано t-критерій Ст'юдента, за відсутності нормального розподілу значень — U-критерій Манна-Уїтні. Статистичний аналіз показників групи в динаміці лікування здійснено за допомогою парного t-критерію у разі нормального розподілу значень та критерію Уїлкоксона — при його відсутності [6].

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Дослідження стану імунної системи первинних хворих молодшої групи до початку лікування виявило її дисфункцію, що проявляється вірогідним зменшенням абсолютної кількості Т-лімфоцитів (CD3<sup>+</sup>), в тому числі цитотоксичних Т-лімфоцитів (CD8<sup>+</sup>), і В-лімфоцитів (CD20<sup>+</sup>) відносно аналогічних показників у практично здорових дітей (p<0,05); проте IPI залишається в межах фізіологічної норми (табл. 1). Необхідно зазначити, що визначення аналогічних показників у дітей зі злоякісними пухлинами головного мозку [9] свідчить про збереження Т-клітинної ланки імунної системи відносно практично здорових дітей, проте суттєвим є збільшення кількості В-лімфоцитів і клітин з маркером ранньої активації (CD25<sup>+</sup>).

Лікування, що проводиться, супроводжується пригніченням лейкопоезу у хворих цієї групи, що на етапі локального контролю, безпосередньо після нього, через 6 та 12 міс після його закінчення проявляється вірогідним зниженням кількості лейкоцитів від-

**Таблиця 1.** Зміни показників імунної системи у дітей молодшої групи, первинних хворих на ЗНМТ, в динаміці лікування

Імунологічні показники	Практично здорові діти	Пацієнти із ЗНМТ, етапи обстеження					
		1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й
Лейкоцити	x10 <sup>9</sup> /л 7,80 ± 0,78	7,61 ± 0,44	3,48 ± 1,11 <sup>2</sup>	4,54 ± 0,62 <sup>2</sup>	4,90 ± 0,72 <sup>2</sup>	4,93 ± 0,64 <sup>2</sup>	6,63 ± 0,68
Лімфоцити	% 46,00 ± 4,60	29,83 ± 4,511	28,80 ± 7,85	28,60 ± 4,64	30,67 ± 2,36	35,50 ± 6,85	31,83 ± 4,13
CD3+	x10 <sup>9</sup> /л 3,51 ± 1,06	2,26 ± 0,37	0,82 ± 0,20 <sup>1,2</sup>	1,27 ± 0,31 <sup>1,2</sup>	1,50 ± 0,24 <sup>1</sup>	1,73 ± 0,32	2,13 ± 0,22
	% 65,11 ± 3,51	62,92 ± 2,17	63,22 ± 2,09	54,00 ± 2,88 <sup>1,2</sup>	53,00 ± 1,00 <sup>1,2</sup>	55,67 ± 4,01	59,00 ± 3,50
CD20+	x10 <sup>9</sup> /л 2,29 ± 0,12	1,40 ± 0,25 <sup>1</sup>	0,77 ± 0,15 <sup>1,2</sup>	0,74 ± 0,28 <sup>1,2</sup>	0,79 ± 0,12 <sup>1</sup>	1,00 ± 0,24 <sup>1</sup>	1,24 ± 0,13 <sup>1</sup>
	% 23,15 ± 4,11	13,08 ± 2,42	9,60 ± 2,86 <sup>1</sup>	11,80 ± 3,02 <sup>1</sup>	13,33 ± 2,89	16,33 ± 1,04	8,33 ± 0,76 <sup>1</sup>
CD4+	x10 <sup>9</sup> /л 0,81 ± 0,14	0,30 ± 0,09 <sup>1</sup>	0,09 ± 0,04 <sup>1,2</sup>	0,14 ± 0,03 <sup>1</sup>	0,21 ± 0,07 <sup>1</sup>	0,28 ± 0,05 <sup>1</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>1</sup>
	% 33,18 ± 6,51	34,23 ± 2,33	28,00 ± 3,66	20,40 ± 2,04 <sup>2</sup>	31,67 ± 7,65	42,33 ± 11,34	42,33 ± 9,81
CD8+	x10 <sup>9</sup> /л 1,16 ± 0,22	0,74 ± 0,14	0,21 ± 0,05 <sup>1,2</sup>	0,27 ± 0,08 <sup>1,2</sup>	0,43 ± 0,05 <sup>1</sup>	0,64 ± 0,07	0,93 ± 0,28
	% 28,65 ± 5,01	22,92 ± 2,30	25,80 ± 3,89	27,00 ± 2,95	24,33 ± 2,25	23,67 ± 3,40	27,33 ± 4,54
CD4+/CD8+	x10 <sup>9</sup> /л 1,01 ± 0,17	0,51 ± 0,09 <sup>1</sup>	0,23 ± 0,06 <sup>1,2</sup>	0,36 ± 0,10 <sup>1</sup>	0,35 ± 0,03 <sup>1</sup>	0,39 ± 0,06 <sup>1</sup>	0,56 ± 0,04 <sup>1</sup>
	% 1,0 – 2,0	1,45	1,09	0,76	1,30	1,79	1,55
HLA DR	% -	23,54 ± 2,47	33,60 ± 5,80 <sup>2</sup>	37,20 ± 2,92 <sup>2</sup>	29,67 ± 5,48	24,33 ± 2,84	21,67 ± 3,18
	x10 <sup>9</sup> /л -	0,46 ± 0,08	0,29 ± 0,10	0,49 ± 0,14	0,47 ± 0,15	0,45 ± 0,12	0,47 ± 0,10
CD16+	% -	17,62 ± 2,26	19,80 ± 2,08	25,40 ± 3,91	23,33 ± 4,25	24,67 ± 7,42	27,00 ± 4,27
	x10 <sup>9</sup> /л -	0,37 ± 0,06	0,17 ± 0,05 <sup>2</sup>	0,34 ± 0,10	0,33 ± 0,02	0,36 ± 0,04	0,57 ± 0,12
CD95+	% -	51,00 ± 5,39	67,40 ± 5,91 <sup>2</sup>	62,60 ± 4,71	37,00 ± 3,12	38,00 ± 9,00	40,67 ± 5,35
	x10 <sup>9</sup> /л -	1,11 ± 0,18	0,52 ± 0,12	0,88 ± 0,26	0,57 ± 0,13	0,83 ± 0,34	0,86 ± 0,14
CD4+25+	% -	12,17 ± 2,80	7,20 ± 1,20	8,25 ± 1,49	7,33 ± 0,29	8,33 ± 0,29	8,67 ± 1,15
	x10 <sup>9</sup> /л -	0,19 ± 0,06	0,10 ± 0,03	0,13 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,18 ± 0,02

Примітки:

<sup>1</sup>Відмінності від показника у практично здорових дітей статистично вірогідні (p<0,05);

<sup>2</sup>Відмінності від показника до лікування статистично вірогідні (p<0,05).



носно показників до лікування та вікової норми (див. **табл. 1**). Наслідком цього є суттєве зменшення на етапах лікування загальної кількості лімфоцитів, абсолютної кількості Т-лімфоцитів, в тому числі клітин з фенотипом CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> (Т-хелпери та Т-супресори/цитотоксичні), а також В-лімфоцитів відносно показників до лікування та вікової норми (p<0,05). Безпосередньо після закінчення лікування порушується співвідношення субпопуляцій Т-лімфоцитів: ІРІ зменшується до 0,76, проте через 6 міс він відновлюється до величини вікової норми і зберігається таким до кінця строку спостереження.

У первинних хворих старшої вікової групи до лікування відмічали аналогічні зміни в імунній системі (**табл. 2**): на тлі зниження загальної кількості лімфоцитів відмічають зменшення абсолютної кількості CD3<sup>+</sup>-, в тому числі CD8<sup>+</sup>-лімфоцитів, а також В-лімфоцитів відносно показників вікової норми (p<0,05).

Вже на етапі локального контролю відзначаються більш глибокі порушення в імунній системі: абсолютна кількість CD3<sup>+</sup>-лімфоцитів, в тому числі CD4<sup>+</sup>- та CD8<sup>+</sup>-лімфоцитів, та CD20<sup>+</sup>-лімфоцитів вірогідно знижується порівняно з показниками до лікування (p<0,05). Безпосередньо після закінчення лікування вірогідно нижчим за показники до лікування залишається абсолютний

вміст CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- та CD20<sup>+</sup>-лімфоцитів (p<0,05). Це обумовлює зменшення ІРІ до 0,98 безпосередньо після закінчення лікування. Абсолютна кількість лімфоцитів залишається вірогідно нижчою за вікову норму через 1 рік, а абсолютна Т-лімфопенія — через 2 роки після закінчення лікування.

Враховуючи, що маркер CD25 є не тільки показником активації лімфоцитів, але й значною мірою маркером регуляторних Т-клітин, які перешкоджають ефективній імунологічній відповіді організму на пухлину [1], важливо відзначити, що на етапі локального контролю у цих хворих збільшується відносна кількість CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>-лімфоцитів.

Характерним для первинних хворих обох вікових груп є збільшення вмісту клітин, що несуть HLA-DR-антигени, та клітин, що експресують рецептор апоптозу (CD95<sup>+</sup>). Ці показники на 2- та 3-му етапах спостереження вірогідно перевищують такі до лікування (див. **табл. 1, 2**). На етапах динамічного спостереження після закінчення лікування (4-, 5-, 6-й етапи) обидва показники знижуються до вихідних значень. Привертає увагу зменшення абсолютної кількості природних кілерних клітин (ПКК) на етапі локального контролю (p<0,05), але їх відносний вміст має тенденцію до збільшення; через 2 роки після закінчення лікування у дітей стар-

шої групи суттєво збільшується відносна та абсолютна кількість ПКК.

Незважаючи на те що деякі автори повідомляють про незначні порушення в системі гуморальної ланки імунної системи на ранніх стадіях захворювання [13], ми отримали дещо інші результати. У хворих обох вікових груп вірогідно знижена абсолютна кількість В-лімфоцитів (див. **табл. 1, 2**). У хворих молодшої вікової групи на етапах динамічного спостереження після закінчення лікування відмічають гіпоімунглобулінемію А, а рівні Іg М та G реєструються в межах вікової норми (**табл. 3**). У старшій групі виявляють підвищену вмісту Іg М до лікування та вірогідне зниження його на етапах лікування. Гіперімунглобулінемія G реєструється через 1 рік після закінчення лікування (**табл. 4**).

Рівень ЦІК у первинних хворих молодшої вікової групи відмічають у межах (1,87–2,64) мг/мл (див. **табл. 3**), старшої вікової групи — в межах (1,77–2,54) мг/мл (див. **табл. 4**). В обох групах цей показник упродовж лікування вірогідно не змінюється.

У хворих, що знаходяться в стані ремісії, відзначено вірогідне зменшення абсолютної кількості лімфоцитів безпосередньо після та через 6 міс після закінчення лікування (**табл. 5**). Ймовірно, зменшення їх кількості відбувається за рахунок Т-лімфоцитів, абсолютна кількість яких вірогідно зменшена безпосередньо після та через 6 міс після закінчення лікування. Проте, обидва показники відновлюються до величин у практично здорових дітей через 12 міс після закінчення лікування, в тому числі абсолютна кількість CD3<sup>+</sup>- та CD4<sup>+</sup>-лімфоцитів в цей строк вірогідно перевищує вихідні значення (p<0,05).

На відміну від первинних хворих, у яких на етапах динамічного спостереження після закінчення лікування відбувається зростання кількості ПКК, у хворих в стані ремісії відмічають зменшення їх відносної кількості, і через 1 рік після закінчення лікування їх вміст вірогідно менший за початковий рівень (p<0,05).

У хворих на ЗНМТ в стані ремісії в усі досліджувані періоди гуморальна ланка імунної системи залишається збереженою: кількість В-лімфоцитів та вміст Іg основних класів та ЦІК не відрізняються від аналогічних показників у практично здорових дітей (**табл. 6**).

Пацієнти, що закінчили лікування і знаходяться в стані ремісії, мають вірогідно більшу кількість лейкоцитів, Т-клітин, в тому числі CD4<sup>+</sup>- та CD8<sup>+</sup>-

**Таблиця 2.** Зміни показників імунної системи у дітей старшої групи, первинних хворих на ЗНМТ, в динаміці лікування

Імунологічні показники	Практично здорові діти	Пацієнти із ЗНМТ, етапи обстеження				
		1-й	2-й	3-й	4-й	5-й
Лейкоцити	x10 <sup>9</sup> /л 6,00 ± 1,21	5,69 ± 0,86	5,05 ± 1,19	3,50 ± 0,58	4,75 ± 0,69	4,70 ± 0,70
Лімфоцити	% 40,00 ± 4,12	34,39 ± 3,95	23,95 ± 4,45	25,75 ± 4,35	34,25 ± 5,53	36,50 ± 7,50
CD3 <sup>+</sup>	x10 <sup>9</sup> /л 3,25 ± 0,41	1,54 ± 0,20 <sup>1</sup>	0,78 ± 0,14 <sup>1,2</sup>	0,75 ± 0,08 <sup>1,2</sup>	1,67 ± 0,41 <sup>1</sup>	1,77 ± 0,61
	% 59,14 ± 3,76	69,39 ± 2,28 <sup>1</sup>	66,55 ± 3,59	64,30 ± 3,69	58,25 ± 4,33	53,00 ± 5,00
CD20 <sup>+</sup>	x10 <sup>9</sup> /л 1,95 ± 0,12	1,03 ± 0,13 <sup>1</sup>	0,50 ± 0,10 <sup>1,2</sup>	0,49 ± 0,06 <sup>1,2</sup>	0,91 ± 0,19 <sup>1</sup>	0,91 ± 0,24 <sup>1</sup>
	% 13,57 ± 4,39	8,44 ± 0,87	7,27 ± 2,30	9,30 ± 3,12	13,75 ± 3,57	9,50 ± 1,50
CD4 <sup>+</sup>	x10 <sup>9</sup> /л 0,45 ± 0,15	0,13 ± 0,02 <sup>1</sup>	0,05 ± 0,02 <sup>1,2</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>1,2</sup>	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,09
	% 29,57 ± 6,24	37,61 ± 1,93	29,45 ± 2,84	27,90 ± 3,57	27,75 ± 1,25	25,00 ± 1,00
CD8 <sup>+</sup>	x10 <sup>9</sup> /л 0,96 ± 0,20	0,57 ± 0,09	0,21 ± 0,03 <sup>1,2</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>1,2</sup>	0,46 ± 0,12	0,45 ± 0,17
	% 25,00 ± 4,93	28,56 ± 1,61	28,18 ± 3,76	28,50 ± 2,72	30,50 ± 4,41	26,00 ± 2,00
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	x10 <sup>9</sup> /л 0,82 ± 0,16	0,41 ± 0,04 <sup>1</sup>	0,23 ± 0,06 <sup>1,2</sup>	0,23 ± 0,04 <sup>1,2</sup>	0,45 ± 0,07	0,45 ± 0,13
HLA DR	1,1 – 1,7	1,32	1,05	0,98	0,91	0,96
	% -	19,61 ± 1,62	37,64 ± 4,28 <sup>2</sup>	39,40 ± 4,89 <sup>2</sup>	33,00 ± 3,89	29,00 ± 5,00
	x10 <sup>9</sup> /л -	0,27 ± 0,03	0,31 ± 0,09	0,30 ± 0,05	0,50 ± 0,09	0,48 ± 0,09
CD16 <sup>+</sup>	% -	16,22 ± 1,68	19,73 ± 2,15	23,70 ± 2,20 <sup>2</sup>	24,75 ± 3,07	39,00 ± 5,00 <sup>2</sup>
	x10 <sup>9</sup> /л -	0,24 ± 0,04	0,15 ± 0,04 <sup>2</sup>	0,19 ± 0,03	0,43 ± 0,14	0,66 ± 0,15 <sup>2</sup>
CD95 <sup>+</sup>	% -	47,50 ± 3,18	77,18 ± 4,79 <sup>2</sup>	69,90 ± 4,89	55,75 ± 3,33	46,00 ± 9,00
	x10 <sup>9</sup> /л -	0,66 ± 0,07	0,57 ± 0,11	0,51 ± 0,05 <sup>2</sup>	0,91 ± 0,23	0,76 ± 0,12
CD4 <sup>+</sup>	% -	13,58 ± 1,54	15,78 ± 2,17 <sup>2</sup>	12,50 ± 1,98	7,00 ± 1,08	7,00 ± 1,00
25+	x10 <sup>9</sup> /л -	0,16 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,03

Примітки:

<sup>1</sup> Відмінності від показника у практично здорових дітей статистично вірогідні (p<0,05);

<sup>2</sup> Відмінності від показника до лікування статистично вірогідні (p<0,05).

**Таблиця 3.** Зміни в гуморальній ланці імунної системи у дітей молодшої групи, первинних хворих на ЗНМТ, в динаміці лікування

Імунологічні показники	Практично здорові діти	Пацієнти із ЗНМТ, етапи обстеження					
		1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й
Ig A, мкмоль/л	9,68 ± 1,94	6,44 ± 1,06	6,63 ± 0,56	7,50 ± 2,69	2,75 ± 1,56 <sup>1</sup>	1,50 ± 0,37 <sup>1</sup>	4,25 ± 0,81 <sup>1</sup>
Ig M, мкмоль/л	1,23 ± 0,15	1,56 ± 0,16	1,54 ± 0,40	1,20 ± 0,31	1,25 ± 0,30	1,22 ± 0,08	1,42 ± 0,20
Ig G, мкмоль/л	90,94 ± 12,56	75,81 ± 9,50	84,25 ± 12,94	79,13 ± 15,31	70,00 ± 15,87	77,38 ± 12,43	84,25 ± 6,81
ЦІК, мг/мл	-	2,55 ± 0,43	2,11 ± 0,49	2,64 ± 1,00	2,98 ± 0,11	1,87 ± 0,39	2,10 ± 0,61

Примітка: <sup>1</sup> відмінності від показника у практично здорових дітей статистично вірогідні (p<0,05).

**Таблиця 4.** Зміни в гуморальній ланці імунної системи у дітей старшої групи, первинних хворих на ЗНМТ, в динаміці лікування

Імунологічні показники	Практично здорові діти	Пацієнти із ЗНМТ, етапи обстеження				
		1-й	2-й	3-й	4-й	5-й
Ig A (мкмоль/л)	9,13 ± 1,56	12,00 ± 1,31	12,69 ± 2,06	12,75 ± 1,88	14,63 ± 3,43	5,43 ± 0,06
Ig M (мкмоль/л)	1,30 ± 0,12	1,80 ± 0,20 <sup>1</sup>	1,17 ± 0,15 <sup>2</sup>	1,24 ± 0,17 <sup>2</sup>	1,06 ± 0,17	0,77 ± 0,10 <sup>1</sup>
Ig G (мкмоль/л)	92,56 ± 8,25	108,63 ± 4,75	97,75 ± 10,62	107,31 ± 9,06	102,93 ± 11,75	120,69 ± 8,44 <sup>1</sup>
ЦІК (мг/мл)	-	2,30 ± 0,33	2,27 ± 0,37	1,77 ± 0,36	2,43 ± 0,54	2,54 ± 1,90

Примітки: <sup>1</sup> відмінності від показника у практично здорових дітей статистично вірогідні (p<0,05); <sup>2</sup> відмінності від показника до лікування статистично вірогідні (p<0,05).

**Таблиця 5.** Зміни показників імунної системи у дітей із ЗНМТ, що знаходяться в стані ремісії

Імунологічні показники	Практично здорові діти	Пацієнти із ЗНМТ, етапи обстеження			
		1-й	2-й	3-й	
Лейкоцити	x10 <sup>9</sup> /л	6,00 ± 1,21	5,56 ± 0,58 <sup>3</sup>	6,90 ± 0,82	6,04 ± 0,63
Лімфоцити	%	40,00 ± 4,12	29,25 ± 5,38	27,67 ± 3,13	36,30 ± 4,39
	x10 <sup>9</sup> /л	3,25 ± 0,41	1,47 ± 0,40 <sup>1</sup>	1,82 ± 0,15 <sup>1</sup>	2,17 ± 0,27
CD3+	%	59,14 ± 3,76	60,63 ± 6,79	64,17 ± 2,80	69,60 ± 0,68
	x10 <sup>9</sup> /л	1,95 ± 0,12	1,16 ± 0,30 <sup>1,3</sup>	1,20 ± 0,11 <sup>1</sup>	1,52 ± 0,18 <sup>2</sup>
CD20+	%	13,57 ± 4,39	10,63 ± 2,71	12,83 ± 2,01	11,20 ± 1,46
	x10 <sup>9</sup> /л	0,45 ± 0,15	0,22 ± 0,08	0,23 ± 0,04	0,25 ± 0,05
CD4+	%	29,57 ± 6,24	28,88 ± 3,70	29,00 ± 2,91	35,40 ± 3,31 <sup>3</sup>
	x10 <sup>9</sup> /л	0,96 ± 0,20	0,57 ± 0,17 <sup>3</sup>	0,54 ± 0,06	0,76 ± 0,08 <sup>2</sup>
CD8+	%	25,00 ± 4,93	30,25 ± 2,71	29,00 ± 3,28	30,00 ± 4,23
	x10 <sup>9</sup> /л	0,82 ± 0,16	0,54 ± 0,13 <sup>3</sup>	0,53 ± 0,07	0,66 ± 0,12
CD4+/CD8+		1,1 – 1,7	0,95	1,00	1,18
HLA DR	%	-	30,63 ± 4,42	31,33 ± 4,92	27,00 ± 5,53
	x10 <sup>9</sup> /л	-	0,43 ± 0,07	0,59 ± 0,11	0,61 ± 0,15
CD16+	%	-	24,50 ± 5,72	17,67 ± 2,30	13,60 ± 1,21 <sup>2,3</sup>
	x10 <sup>9</sup> /л	-	0,34 ± 0,07	0,33 ± 0,05	0,30 ± 0,06
CD <sup>95</sup> +	%	-	55,50 ± 5, <sup>90</sup>	54,83 ± 5,83	55,20 ± 7, <sup>90</sup>
	x10 <sup>9</sup> /л	-	0,8 <sup>9</sup> ± 0,20	1,04 ± 0,15	1,25 ± 0,27 <sup>2</sup>
CD4+25+	%	-	10,33 ± 2,03	11,00 ± 1,78	<sup>9</sup> 6,0 ± 1,25
	x10 <sup>9</sup> /л	-	0,24 ± 0,11	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,03

Примітки: <sup>1</sup> відмінності від показника у практично здорових дітей статистично вірогідні (p<0,05); <sup>2</sup> відмінності від показника до лікування статистично вірогідні (p<0,05); <sup>3</sup> відмінності від відповідного показника у первинних хворих старшої групи статистично вірогідні (p<0,05).

**Таблиця 6.** Зміни в гуморальній ланці імунної системи у дітей із ЗНМТ, що знаходяться в стані ремісії

Імунологічні показники	Практично здорові діти	Пацієнти із ЗНМТ, етапи обстеження		
		1	2	3
Ig A, мкмоль/л	9,13 ± 1,56	12,25 ± 1,88	8,69 ± 2,19	10,81 ± 3,25
Ig M, мкмоль/л	1,30 ± 0,12	1,03 ± 0,25	1,36 ± 0,22	1,26 ± 0,32
Ig G, мкмоль/л	92,56 ± 8,25	92,19 ± 6,56	87,94 ± 11,37	89,63 ± 14,88
ЦІК, мг/мл	-	1,87 ± 0,34	2,57 ± 0,34	2,52 ± 0,36

лімфоцитів, порівняно з групою первинних хворих (в обох групах безпосередньо після закінчення лікування). Через 1 рік після закінчення лікування хворі цих груп розрізняються (p<0,05) тільки за відносною кількістю CD4<sup>+</sup>- та CD16<sup>+</sup>-лімфоцитів.

**ВИСНОВКИ**

1. В імунній системі дітей, хворих на ЗНМТ, формуються порушення як в її клітинній, так і в гуморальній ланках, що проявляється зменшенням кількості CD3<sup>+</sup>-, CD20<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-лімфоцитів в циркуляції на тлі зменшення загальної кількості лімфоцитів в периферичній крові та дисімуноглобулінемією. Наявність цих порушень може

бути використана в якості показання для проведення реабілітації імунної системи.

2. Під впливом інтенсивної ПХТ порушення в імунній системі дітей, хворих на ЗНМТ, поглиблюються: на етапах лікування відмічають пригнічення показників, що характеризують стан клітинної ланки імунної системи, які не відновлюються через 1–2 роки після закінчення лікування.

3. У дітей, що закінчили повний курс лікування і знаходяться в стані ремісії, реєструють менші порушення клітинної ланки імунної системи безпосередньо після лікування, а через 12 міс після закінчення лікування всі досліджені показники відновлюються до рівня у практично здорових дітей. Порушен

в гуморальній ланці імунної системи у цих хворих не зареєстровано.

4. Система природної резистентності є збереженою в обох досліджуваних групах хворих, зокрема, кількість CD16<sup>+</sup>-клітин (ПКК) не відрізняється від відповідних показників у практично здорових дітей.

5. Виявлені порушення в імунній системі дітей з прогностично несприятливими формами ЗНМТ обґрунтовують необхідність імунореабілітації, яка може покращити ефективність їх основного лікування з подовженням безрецидивного періоду та збільшенням виживаності.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Абрамов М.Е., Кадагидзе З.Г., Славина Е.Г. и др. (2006) Ингарон (интерферон гамма) в сочетании с химиотерапией в лечении онкологических больных. Фарматека, 11: 38–42.
2. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение (2008) Под ред. С.В. Хайдукова, А.В. Зурочки. Челябинск. 195 с.
3. Гриневич Ю.А., Каменец Л.Я. (1986) Основы клинической иммунологии опухолей. К.: Здоров'я, 158 с.
4. Капулер О.М., Нелюбин Е.В., Каут Д.А. и др. (2006) Апоптоз лимфоцитов при псориазе // Медицинская иммунология. 8(4): 531–538.
5. Козлов В.А., Ярилин А.А., Аметов А.С. и др. (2008) Естественные регуляторные Т-клетки и связанные с ними цитокины при хроническом аутоиммунном тиреоидите. Иммунология, 29 (6): 357–361.
6. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. (2001) Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: Морион. 408 с.
7. Никулин Б.А. (2008) Оценка и коррекция иммунного статуса. М.: ГЭОТАР-Медиа. 376 с.
8. Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В. и др. (2001) Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. М.: 5–10.
9. Хаматдинова З.Р., Хисамова Н.Ф., Хайрулина Р.М. (2010) Иммунологическая реактивность и ДНК-цитометрия клеток периферической крови при онкологических заболеваниях у детей. Мед. иммунология. 12(1–2): 65–70.
10. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. (2009) Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа: 352 с.
11. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А. и др. (2003) Феномен Т-клеточной анергии при хирургическом сепсисе. Мед. иммунология. Т. 5, 5–6: 529–538.
12. Ярилин А.А. (2007) Естественные регуляторные Т-клетки. Росс. мед. журн., 1: 43–48.
13. Abrahamsson J., Marky I., Mellander L. (1995) Immunoglobulin levels and lymphocyte response to mitogenic stimulation in children with malignant disease during treatment and follow-up// Acta Paediatr., 84(2): 177–82.
14. Alanko S., Pelliniemi T.T., Salmi T.T. (1994) Recovery of blood lymphocytes and serum immunoglobulins after treatment of solid tumors in children. Pediatr. Hematol. Oncol.,(1): 33–45.
15. Kotsakis A., Sarra E., Peraki M. et al. (2000) Docetaxel-induced lymphopenia in patients with solid tumors: a prospective phenotypic analysis. Cancer. 89(6): 1380–1386.
16. Schirrmacher V., Feuerer M., Beckhove P. et al. (2002) T Cell Memory, Anergy and Immunotherapy in Breast Cancer. J. of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 7 (2): 201–207.
17. Widen K., Mozaffari F., Choudhury A. et al. (2008) Overcoming immunosuppressive mechanisms. Annals of Oncology. 29 ( 7): 241–247.
18. Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. (2006) Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion // Nature Reviews. Immunol. 6: 715–727.

**Иммунологический мониторинг детей с прогностически неблагоприятными формами злокачественных новообразований мягких тканей в динамике комплексного лечения**

*Е.С. Шумилина, Ю.А. Гриневич, С.Н. Кукушкина, А.Д. Лен, Ф.В. Фильчаков, Г.И. Климнюк, Э.В. Шайда*

**Национальный институт рака, Киев**

**Резюме.** Изучено состояние иммунной системы у 42 детей со злокачественными новообразованиями мягких тканей в динамике лечения: 32 пациента с впервые установленным диагнозом и 10 больных, закончивших лечение и находящихся в состоянии ремиссии. У обследованных детей отмечают нарушения как в клеточном, так и в гуморальном звене иммунной системы, что проявляется уменьшением количества CD3<sup>+</sup>-, CD20<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов в циркуляции на фоне снижения общего количества лимфоцитов в периферической крови, а также дисиммуноглобулинемией. Проведение интенсивной полихимиотерапии усугубляет нарушения в иммунной системе этих детей, которые не восстанавли-

ваются через 1–2 года после окончания лечения. У детей, находящихся в состоянии ремиссии, отмечают менее глубокие нарушения клеточного звена иммунной системы непосредственно после окончания лечения; спустя 12 мес после лечения все исследованные показатели восстанавливаются до уровня у практически здоровых детей. Выявленные нарушения в иммунной системе детей обосновывают необходимость иммунореабилитации, которая может повысить эффективность их лечения с продлением безрецидивного периода и увеличением выживаемости.

**Ключевые слова:** дети со злокачественными новообразованиями мягких тканей, иммунологический мониторинг, иммунофенотип лимфоцитов, активационные маркеры лимфоцитов.

**Immunomonitoring of children with prognostic unfavourable soft tissue sarcomas during complex treatment**

*K.S. Shumilina, Yu.A. Grinevich, S.M. Kukushkina, A.D. Lon, F.V. Fil'chakov, G.I. Klimnjuk, E.V. Shajda*

**National cancer institute, Kyiv**

**Summary.** The condition of immune system at 42 children with prognostic unfavourable soft tissue sarcomas during complex treatment is investigated: 32 patients with for the first time established diagnosis and 10 — finished treatment and taking place in a condition of remission. At surveyed children disorders both in cellular and in humoral component of immune system are observed. That is shown by reduction of quantity of CD3<sup>+</sup>-, CD20<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-lymphocytes, decrease of total lymphocytes in peripheral blood, and also dysimmunoglobulinemia. Carrying out of intensive polychemotherapy aggravates disorders in immune system of these children which are not restored in 1–2 years after the ending of treatment. Children who are taking place in a condition of remission, have less deep disorders of a cellular link of immune system directly after the ending of treatment; later 12 months all parameters are restored up to a level at practically healthy children. The revealed disorders in immune system of children prove necessity immunorehabilitation which can increase efficiency of their treatment with prolongation of recurrence-free period and increase in survival rate.

**Key words:** children with soft tissue sarcomas, immunomonitoring, lymphocyte phenotype, activation markers.