



Министерство Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий



Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова»

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЗАЩИТЫ У СПЕЦИАЛИСТОВ МЧС РОССИИ

Методические рекомендации

ISBN 978-5-906841-87-2



9 785906 841872

www.nrcerm.ru
E-mail: medicine@nrcerm.ru

Санкт-Петербург
2016

**МИНИСТЕРСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДЕЛАМ
ГРАЖДАНСКОЙ ОБОРОНЫ, ЧРЕЗВЫЧАЙНЫМ СИТУАЦИЯМ
И ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ СТИХИЙНЫХ БЕДСТВИЙ**

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины
имени А.М. Никифорова»

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач МЧС России
Заслуженный врач РФ
д.м.н. профессор



С.С. Алексанин

«09» июня 2016 г.

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЗАЩИТЫ
У СПЕЦИАЛИСТОВ МЧС РОССИИ**

Методические рекомендации

Санкт-Петербург
2016

УДК 612.017-07:616.33

Исследование механизмов противоопухолевой защиты у специалистов опасных профессий / под ред. С.С. Алексанина – СПб.:ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, 2016. - 40 с.

Авторы: д.м.н. проф. Н.М. Калинина, к.м.н. Н.И. Давыдова, к.м.н. М.В. Санников, к.б.н. Н.В. Бычкова, к.м.н. Л.И. Васякина

В методических рекомендациях представлен анализ данных литературы по теме исследования, обоснована необходимость комплексного изучения функциональной активности лимфоцитов, осуществляющих противоопухолевую защиту, ростовых тканевых факторов и опухолеассоциированных антигенов для определения индивидуального подхода к иммунотерапии больных раком мочевого пузыря. Уточнены референтные интервалы содержания в моче мочевого онкогенного пептида (UBC) у здоровых лиц, а также получены данные, подтверждающие значимость этого показателя для диагностики рака мочевого пузыря.

Рекомендации разработаны в ходе выполнения НИР «Исследование механизмов противоопухолевой защиты у специалистов опасных профессий». (НИР «Опухоль-В» п. 1-1-5.2-3/Б2 плана научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ МЧС России на 2015 год и направлений перспективных научных исследований до 2020 года, утвержденного приказом МЧС России от 19.12.2014 № 712, с изменениями утвержденными приказом МЧС России от 28.09.2015 № 519.

Методические рекомендации предназначены для медицинских учреждений МЧС России в качестве методических рекомендаций для практического применения, а также в образовательном процессе для подготовки аспирантов, ординаторов, врачей, проводящих диспансеризацию и оказывающих специализированную помощь спасателям и сотрудникам ФПС ГПС МЧС России.

Рецензент:

С.В. Дударенко д.м.н. заведующий отделом терапии и интегративной медицины ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России

СОДЕРЖАНИЕ

Содержание	3
Перечень сокращений, условных обозначений	4
Введение	5
Обзор литературы	6
Материалы и методы	25
Результаты собственных исследований	29
Заключение	35
Список литературы	37

Перечень сокращений, условных обозначений

TRC- антигенраспознающий рецептор Т-лимфоцитов (T-cell receptor)

TLR- Тоол-подобный рецептор (Toll-like receptor)

KGF-1, KGF-2 - факторы роста кератиноцитов (keratinocyte growth factors)

IRF-1 - Insulin-related factor 1 (инсулинвысвобождающий фактор)

НК-клетки - натуральные киллерные клетки (natural killer cells)

TNK-клетки - клетки, несущие маркеры как Т, так и НК-лимфоцитов

CD - кластер дифференцировки

ЭМП - эпителиально-мезенхимальное трансформация (EMT-Epithelial Mesenchmal Transition)

VEGF - эндотелиальный фактор роста сосудов

PDGF - тромбоцитарный фактор роста

TGF- β - трансформирующий фактор роста

HIF1 - фактор, индуцируемым гипоксией

PMI - рак мочевого пузыря

MDR - множественная лекарственная устойчивость

ПКР - почечно-клеточный рак

EGFR2 - рецептор эпидермального фактора роста

IAP - ингибиторы апоптоза (Inhibitors of apoptosis)

ПАМП - патогенассоциированные молекулярные паттерны

MHC – главный комплекс гистосовместимости (Major histocompatibility complex)

TRAIL - TNF- related apoptosis inducing ligand

DR5 - Death domain 5

ВВЕДЕНИЕ

Анализ результатов исследований показателей иммунной системы пожарных и спасателей, проведенных в рамках предыдущих НИР, позволил выявить сочетанную недостаточность в Т-клеточном звене и в системе неспецифической резистентности. Иммунный дефицит характеризовался уменьшением количества цитотоксических Т-лимфоцитов, снижением киллерного потенциала, реализуемого цитотоксическими Т-лимфоцитами и натуральными киллерными клетками (НК-клетки), т.е. функциональной активности этих клеток. Установлено увеличение количества лимфоцитов периферической крови, а среди них и клеток-эффекторов (цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллерных клеток), экспрессирующих маркеры готовности к апоптозу, что также свидетельствует о функциональной несостоятельности этих клеток и обуславливает неадекватную противовирусную и противоопухолевую защиту.

Учитывая увеличивающуюся со стажем длительность и интенсивность воздействия комплекса факторов, оказывающих влияние, в том числе на механизмы поддержания гомеостаза, реализуемые при участии иммунной системы, целесообразно включить в иммунологическое обследование лиц опасных профессий определение количественных характеристик клеток - эффекторов, осуществляющих противоопухолевую защиту и показателей функциональной активности этих клеток. В сочетании с иммунологическими показателями необходимо определять в биологических средах уровни опухолеассоциированных маркеров, характеризующихся наибольшей информативностью (высокие специфичность, чувствительность).

У пациентов с раком мочевого пузыря необходимо проводить мониторинг этих показателей до оперативного лечения и на фоне проводимой терапии с учетом гистологического варианта опухоли, стадии дифференцировки, стадии опухолевого процесса, соматического статуса пациента. Анализ полученных данных позволит обосновать целесообразность исследования этих показателей для контроля рецидива заболевания, метастазирования опухоли, а также для включения в комплекс лечебных мероприятий иммунокорректирующих препаратов, индивидуализировать иммунотерапию в соответствии с результатами обследования.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В 2000 году D. Hanahan, R. Weinberg на основе молекулярно-генетических данных сформулировали признаки, отличающие опухолевые клетки от их нормальных предшественников. По мнению авторов, все или почти все опухоли характеризуются несколькими неотъемлемыми чертами.

К их числу относится самодостаточность в отношении сигналов пролиферации, связанная с аутопродукцией факторов роста, соответствующих рецепторов или других компонентов сигнального промитотического каскада. Нормальной клетке для запуска пролиферации необходим сигнал, доставляемый эндокринной системой (гормоны), паракринными механизмами (тканевые факторы роста) или через синаптические окончания нейронов. Трансформированная клетка сама продуцирует подобные сигналы вне зависимости от потребностей организма, что обеспечивает перманентную пролиферацию клеток опухолевого клона.

Опухолевые клетки характеризуются отсутствием чувствительности к сигналам, сдерживающим процесс пролиферации, обусловленным инактивацией супрессорных (антимитотических) белков. Подобная нечувствительность к супрессорным воздействиям возможна в результате утраты соответствующих мембранных рецепторов или других компонентов сигнальных каскадов, участвующих в проведении экстрацеллюлярного сигнала к клеточному ядру.

Другим свойством опухолевых клеток является замедление процессов программируемой клеточной гибели, опосредованное дисбалансом биохимической регуляции процессов апоптоза, т.е. эти клетки, в отличие от нормальных, утратили способность к самоэлиминации, что позволяет сохранять

жизнеспособность при наличии повреждений ДНК и ассоциированных с гиперпролиферацией стрессовых условий существования.

Опухолевые клетки имеют неограниченный репликативный потенциал, сопряженный с реактивацией экспрессии фермента теломеразы, и, как следствие, отсутствие физиологического укорачивания теломер. Этот фермент является одной из перспективных молекулярных мишеней для противоопухолевой терапии.

Трансформированный клон характеризуется стимуляцией процессов ангиогенеза в опухоли, которая обусловлена экспрессией ангиогенных факторов и направлена на удовлетворение повышенных потребностей быстро делящихся неопластических клеток в оксигенации. Формирование сосудистой сети опухоли происходит в результате активных, управляемых трансформированными клетками биологических процессов. Разработка антиангиогенных препаратов также считается одним из перспективных направлений в онкологии.

Ключевым компонентом злокачественной трансформации является способность к инвазии и метастазированию, ассоциированная с продукцией опухолью гистолитических ферментов (протеаз), а также факторов, угнетающих локальный иммунитет.

Геномная нестабильность, опосредованная инактивацией систем репарации ДНК и нарушениями в молекулярном контроле клеточного цикла, обеспечивает ускоренное накопление мутаций в трансформированной клетке. Эта особенность приводит к чрезвычайной биологической пластичности новообразований, которые быстро приспосабливаются к изменяющимся условиям метаболизма и различным лечебным воздействиям. Геномная нестабильность, по-видимому, является основным свойством опухолевых клеток, обеспечивающим «терапевтическое окно» при назначении цитостатических препаратов. Противоопухолевый эффект химиотерапии и

радиации связан с индукцией повреждений ДНК, которые проявляются в процессе клеточного деления, опухолевые клетки обладают большей чувствительностью к ДНК - повреждающим факторам, так как их способность к репарации химических изменений структуры нуклеиновых кислот снижена по сравнению с нормальными клетками.

Злокачественный клон характеризуется перестройкой стромальных компонентов, создающих более благоприятные условия для его эволюции. Стромальные компоненты опухолей отличаются от таковых в нормальных тканях, так, в литературе приводятся данные о наличии соматических мутаций в фибробластах, инфильтрирующих эпителиальные новообразования, отличных от таковых в опухолевых клетках и необходимых для жизнедеятельности опухоли (Имянитов Е.Н., 2010). Независимость малигнизированных клеток эпителия от пролиферативных сигналов может обеспечиваться не только аутокринной стимуляцией, но и секрецией факторов роста фибробластами, окружающими опухоль. Трансформированные эпителиальные клетки секретируют биологически активные вещества, регулирующие адаптацию стромальных элементов к потребностям опухолевого роста.

Weinberg R.A. в 2008г. описал феномен эпителиально-мезенхимального перевоплощения (ЭМП) трансформированных клеток (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT). Под ЭМП подразумевается феномен (обратимого) приобретения эпителиальными клетками некоторых свойств мезенхимальных клеток, проявляющийся в экспрессии соединительнотканых молекулярных маркеров, утрате черт эпителиальной дифференцировки, приобретении способности к миграции. ЭМП рассматривается как компонент опухолевой прогрессии, обеспечивающий инвазию и метастазирование злокачественного клона.

Ранее новообразования рассматривались как относительно гомогенные структуры, состоящие из равноправных клеток и, если в некоторых неоплазмах

имела место гетерогенность, ее считали следствием нестабильности опухолевого генома. В настоящее время появились работы, доказывающие существование иерархии опухолевых клеток, что позволяет рассматривать новообразование как своеобразный «орган». Весьма вероятно, что многим типам малигнизаций присуще существование стволовых клеток. Стволовые клетки в отличие от «дифференцированных» клеток опухоли, представляют небольшую часть опухолевой массы (<1%). Эти клетки не только способны к неограниченному самовоспроизведению, но и отличаются по фенотипическим характеристикам от основной клеточной популяции новообразования, что должно учитываться в стратегии поиска противоопухолевых препаратов, так как основными мишенями для последних являются преобладающие, «дифференцированные» клетки трансформированной ткани (Gupta P.V., 2009).

Единичные опухолевые клетки могут существовать в организме на протяжении многих лет после проведенных оперативного вмешательства и цитостатической терапии. Факторы, ассоциированные с прогрессией этих «дремлющих» клонов в клинически распознаваемые рецидивы заболевания, неизвестны. Возможность длительного бессимптомного существования злокачественных клеточных пулов в организме объясняет особенности опухолевого роста, наблюдаемые в практической онкологии и подтверждает отношение к опухоли не как к изолированному, абсолютно автономному патологическому процессу, а как к компоненту сложной и взаимосвязанной системы биологических взаимодействий с организмом хозяина (Demicheli R., 2008).

Метастазирование является причиной 90% случаев летальных исходов онкологических заболеваний. В настоящее время появились данные о том, что управление процессом метастазирования отчасти может модулироваться первичной опухолью. Доказано, что некоторые неоплазмы секретируют биологически активные вещества, которые доставляются кровотоком к сайтам

метастазирования и способствуют пролиферации трансформированных клеток, что обуславливает поиск лекарственных препаратов, которые могут противодействовать взаимоотношениям между первичной опухолью и отдаленными метастазами и замедлять прогрессию злокачественного процесса (McAllister S.S., et.al., 2008).

Анализ данных молекулярно-генетических исследований канцерогенеза обусловил научно обоснованный поиск специфических противоопухолевых препаратов, направленных на активацию или инактивацию ключевых биохимических компонентов опухолевой трансформации. В настоящее время в практической медицине используется большое количество «таргентных» лекарственных препаратов, разработка которых основывалась на целенаправленном синтезе антагонистов онкоассоциированных молекул. Наиболее широкое использование в клинике получили антитела и низкомолекулярные ингибиторы, направленные на подавление активности белков EGFR, HER2 (Riley L.B., 2009). Одним из направлений противоопухолевой терапии является использование антиангиогенных препаратов, влияющих на неоангиогенез (Корман Д.Б., 2006), действия которых реализуется несколькими механизмами: ингибированием связывания фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) с его рецепторами, модулированием активности металлопротеаз матрикса, индукцией апоптоза эндотелиальных клеток (Bukowski R.M., 2003).

Гипотеза об иммунной реакции отторжения опухоли, клетки которой являются носителями соматических мутаций, впервые была высказана П.Эрлихом в начале XX века, переработана на новой теоретической основе Л.Томасом в конце 1950г. и развита в концепцию иммунного надзора Ф.М. Бернетом в 1970г. Эта концепция предполагает осуществление постоянного надзора иммунной системой за антигенным составом клеток организма и элиминацию клеток, подвергшихся трансформации, признаком которой

является появление на клеточной мембране «измененных своих» антигенов. Существует несколько классификаций опухолевых антигенов, представленные в них данные характеризуют большинство опухолеассоциированных антигенов как нормальные продукты генов организма. Все опухолевые антигены - белки, обычно гликозилированные (табл.1).

Классификация и характеристика опухолевых антигенов*

Таблица 1.

Группы антигенов	Индивидуальные антигены	Характеристика
Вирусные	EBNA(EBV), Eб, E7(HPV), HHV-8	Антигены вирусозбудителей опухоли
Мутантные (уникальные)	p53, Cdk4, Cas8, β-катенин	Продукты мутантных генов, в норме контролирующих апоптоз, клеточный цикл и т.д.
Ракосеменниковые	Серии MAGE(1-12), BAGE, GAGE, NY-ESO-1, SSX2	Антигены, экспрессируемые у эмбрионов и в некоторых органах (гонадах) взрослых
Дифференцировочные	Melan A/VART-1, тирозиназа, gp100, PSA, ANKRD30A/NY-BR-1, GF-AP, TG	Нормальные дифференцировочные антигены
Амплифицированные	HER-2нео, BIRC, циклины B1 и D1, Bcr/Abl	Нормальные усиленно экспрессируемые антигены
Продукты аномального процессинга	MUC-1-MUC-7	Нормальные антигены с чрезмерным гликозилированием

* - А.А. Ярилин, Иммунология, 2010г.

Вирусные антигены - продукты вирусных генов, экспрессируемые в инфицированных клетках. Остальные антигены являются «своими» антигенами с измененной экспрессией, количественно превосходящей норму, проявляющейся в необычные временные периоды или в нехарактерном месте. Чаще встречающийся вариант опухолевых антигенов - эмбриональные белки, в норме экспрессируемые только (или преимущественно) в эмбриональном периоде. Несбалансированное усиление экспрессии (амплификация) характерна для некоторых опухолевых антигенов, например для HER-2neo - рецептора эпидермального фактора роста (EGFR2). Изучается гиперэкспрессия белков BIRC - представителей семейства ингибиторов апоптоза IAP (Inhibitors of apoptosis) и циклинов B1 и D1.

Дифференцировочные антигены являются органоспецифическими антигенами нормальных тканей. При опухолях их экспрессия значительно усиливается, что обуславливает нарушение ауто толерантности, в этом случае иммунный ответ на дифференцировочные антигены носит характер аутоиммунного процесса, проявляется аутоагрессией, т.е. сопровождается повреждением нормальной ткани. Например, паранеопластические неврологические синдромы, обусловленные повреждением нервной системы в результате перекрестного реагирования антител к онкоантигенам с нормальными клетками. В ряде случаев появление у молекулы свойств опухолевого антигена обусловлено усиленными процессами гликозилирования, что характерно для антигенов семейства MUC. Эти белки имеют повторяющиеся домены, содержащие гликозильные группы, которые разделены участками, включающими остатки цистеина, в норме белки служат рецепторами молекул адгезии. Опухолевые антигены маркируют не столько конкретные опухоли (это свойственно в большей степени дифференцировочным антигенам), чаще их экспрессия свидетельствует о наличии злокачественного процесса.

Данные об опухолевых антигенах преимущественно относятся к антигенам, распознаваемым антителами, что обусловлено относительной доступностью серологических методов тестирования антигенов. Однако в контексте механизмов противоопухолевой защиты наиболее важны опухолевые антигены, распознаваемые Т-лимфоцитами. Практически всегда молекулы опухолевых антигенов несут эпитопы (антигенные детерминанты), которые потенциально могут распознаваться как В-, так Т-лимфоцитами. Именно клеточный иммунный ответ, реализуемый клетками – эффекторами, является наиболее адекватным в противоопухолевой защите. Последнее подтверждается отсутствием на клетках опухолей патогенассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) - мобилизирующих факторов врожденного иммунитета, способствующих развитию адаптивного иммунного ответа.

Помимо классических антигенов, опухоли экспрессируют молекулы МІСА и МІСВ - стрессорные молекулы, кодируемые генами МНС класса 1. Третичная структура МІСА и МІСВ сходна с классическими молекулами-продуктами МНС-1, отличие заключается в отсутствии легкой цепи (β 2-микроглобулина). Молекулы МІСА и МІСВ в норме представлены на клетках кишечника, а на других клетках экспрессируются в условиях стресса и при инфицировании вирусами. На опухолевых клетках они экспрессируются с высокой частотой, распознаются поликлональными натуральными киллерными клетками (NK-клетками) и $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитами.

Одна из современных концепций рассматривает стадийную динамику иммунного ответа на развитие опухоли. На 1 стадии (элиминации) срабатывают механизмы иммунологического отторжения клеток, экспрессирующих трансформированные антигены. Успешная элиминация предотвращает развитие опухоли. Если малигнизировавшая клетка избегает апоптоза, наступает длительная стадия равновесия, характеризующаяся сдерживающим влиянием иммунной системы на пролиферативный потенциал

опухолевых клеток. Прогрессирование опухолевого процесса – стадия, характеризующаяся несостоятельностью иммунных механизмов контроля.

Данные исследований в модельных системах и анализа результатов иммунотерапии опухолей человека позволили определить клетки иммунной системы, отвечающие за противоопухолевую защиту. К ним относятся 2 типа клеток-эффекторов: НК-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты. НК-клетки распознают стрессорные молекулы МICA и MICB, экспрессируемые опухолевыми клетками, реализуя цитотоксическую функцию без предварительной дифференцировки. Иммунный ответ, осуществляемый цитотоксическими Т-лимфоцитами, включает несколько стадий. CD8+Т-лимфоциты распознают опухолевые антигены, презентруемые дендритными клетками в составе молекул HLA, при этом активируются клетки ограниченного числа клонов, в соответствии со специфичностью Т-клеточного рецептора (TCR). Механизмы действия цитотоксических клеток: запуск в апоптоз клетки-мишени через Fas-зависимую индукцию апоптоза и классический перфорин - гранзимовый контактный цитолиз опухолевой клетки. При противоопухолевой иммунной защите значимая роль отводится индукции апоптоза, опосредованной взаимодействием молекулы TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) и ее рецептора DR5 (Death domain 5). TRAIL спонтанно экспрессируется НК-клетками, а под влиянием интерферонов 1 и 2 типов на моноцитах и дендритных клетках.

В активации CD8+Т-лимфоцитов принимают участие CD4+Т-лимфоциты, а именно Th1, которые активируют макрофаги, синтезирующие факторы, способствующие нарушению кровотока и формированию тромбов, как следствие - нарушение трофики и гибель опухолевых клеток. Механизм действия еще одной субпопуляции Т-лимфоцитов - $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, участвующих в противоопухолевой защите, не известен (вероятно, прямой цитолиз клетки-мишени). Показатель вовлеченности Т-лимфоцитов в

противоопухолевую защиту - инфильтрация опухоли лимфоидными клетками – TIL (Tumor-infiltrating lymphocytes). Среди них преобладают CD8+T-лимфоциты с признаками активации. Однако подавляющее большинство этих клеток инертны, так как в них блокирована экспрессия цепей TCR –комплекса (ξ -, реже ϵ -цепи). Экспрессия этих цепей может восстанавливаться под влиянием IL-2.

Популяция NK-клетки неоднородна. Различают две функционально разные субпопуляции, которые характеризуются различным уровнем экспрессии на поверхностной мембране CD56 и CD16 рецепторов. Одна из субпопуляций характеризуется низкой экспрессией CD16 и высокой экспрессией CD56 - изоформы адгезивной молекулы из семейства молекул адгезии нервной системы (NCAM м.м. 135000 - 200000). Клетки этой субпопуляции ведут оседлый образ жизни, локализованы в печени, в синусах (Pit- клетки), слизистой оболочке матки, децидуальной оболочке беременной матки.

NK-клетки, экспрессирующие на поверхностной мембране CD16, преобладают в циркуляции, эти клетки несут на мембране другие молекулы адгезии, обуславливающие их способность выйти из кровеносных сосудов в очаг воспаления, эти клетки локализуются и в красной пульпе селезенки.

Несмотря на разную локализацию и различия в экспрессии молекул поверхностных мембран обе субпопуляции относятся к эффекторным клеткам иммунной системы, осуществляющим киллинг или убийство клеток-мишеней. Однако киллинг клеток-мишеней не единственная функция этих клеток. NK-клетки синтезируют широкий спектр цитокинов, участвующих в межклеточных взаимодействиях, при полноценной функции обеспечивают адекватный иммунный ответ, т.е. вторая важная функция этих клеток - регуляторная.

Известно, что НК-клетки не проявляют цитотоксическую активность в отношении нормальных аутологичных клеток, но могут атаковать клетки, дефицитные по антигенам гистосовместимости I класса. По данным литературы, рецепторы, специфичные к МНС I класса, являются клонально распределенными на НК-клетках, каждый НК-клон экспрессирует в среднем 4-5 МНС-специфических ингибиторных рецепторов. Срыв толерантности возможен при недостаточности/отсутствии экспрессии ингибиторных рецепторов, предотвращающих лизис нормальной аутологичной клетки, или при недостаточном запрещающем сигнале, индуцированном собственными МНС молекулами клетки-мишени.

НК-клетки с высокой экспрессией CD56 характеризуются более высокими уровнями продукции цитокинов в сравнении с другой субпопуляцией, имеющей низкую экспрессию CD56, но высокую плотность CD16 и более значимый цитотоксический потенциал (Cooper M A et al., 2001)

К числу эндогенных противоопухолевых факторов относятся IFN- γ -цитокин, подавляющий пролиферацию опухолевых клеток, влияя на белки p21 и p27, ослабляющие экспрессию циклинзависимых киназ – соответственно Cdk2 и Cdk4, обеспечивающих продвижение клеток по циклу. Этот цитокин способствует апоптозу опухолевых клеток, индуцируя экспрессию каспазы 1 и Fas-лиганда на цитотоксических Т-лимфоцитах, также стимулирует синтез опухолевыми и стромальными клетками хемокинов CXCL9 (MIG) CXCL10 (IP-1), которые усиливают миграцию в опухоль Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор для этих хемокинов (CXCR3). Цитокин IFN- γ - мощный активатор макрофагов, стимулятор активации Th 1, необходимых для развития и усиления противоопухолевого ответа.

Иммунная реакция на опухолевые антигены включает гуморальный ответ, однако он не обладает протективным действием. Способность антител блокировать антигены-мишени обуславливает защиту опухолевой клетки от

цитотоксического действия клеток-эффекторов, этот механизм защиты опухоли известен давно и обозначается термином «эффект усиления опухолевого роста». Антитела к опухолеассоциированным антигенам сигнализируют о наличии опухолевого процесса, их определение используется с диагностической целью. На основе таких антител разрабатываются иммунотерапевтические препараты – иммунотоксины.

Таким образом, при запуске противоопухолевого иммунного ответа в его реализацию вовлекаются все звенья врожденного и адаптивного иммунитета, но основной эффект реализуют клетки-эффекторы CD8+Т-лимфоциты и NK-клетки. Иммунные механизмы не способны вызвать отторжения сформировавшейся опухоли, это обусловлено их недостаточной эффективностью, а также способностью опухолевых клеток избегать действия клеток-эффекторов.

Опухолевые клетки обладают разнообразными механизмами, позволяющими избежать действия факторов иммунного надзора.

Опухолетрансформированные клетки не экспрессируют ПАМП, что снижает их иммуногенность, поскольку презентацию антигенных эпитопов Т-клеткам осуществляют дендритные клетки, не подвергшиеся стимуляции в условиях провоспалительного окружения, индуцируемого ПАМП. В большинстве случаев к опухолевым антигенам развивается иммунологическая толерантность.

Если опухолевая клетка несет на поверхности классические молекулы HLA1 –А, В, С и неклассические молекулы HLA-G или Е, она подвергается цитотоксическому действию CD8+Т-лимфоцитов, распознающих классические молекулы HLA1. NK-клетки не участвуют в элиминации таких клеток, так как активность эффекторов блокируется антигенами HLA1 (классическими и неклассическими). Если опухолевая клетка утратила все антигены HLA, что часто имеет место при опухолевой прогрессии, но экспрессирует стрессорные

молекулы, она становится мишенью NK-клеток. Если опухолевая клетка утратила классические антигены HLA1, но сохранила неклассические, она становится недоступной для действия киллеров – ни NK-клеток (их реакция блокирована неклассическими антигенами HLA), ни CD8+Т-лимфоцитов (распознаваемый ими комплекс антигенного пептида с молекулой HLA 1-отсутствует), что позволяет опухоли избежать иммунного надзора.

Опухолевый антиген может исчезнуть с мембраны опухолевой клетки в результате мутации или модуляции антител, направленных к этому антигену.

Опухолевые клетки секретируют растворимые формы антигенов, в частности растворимые формы стрессорных белков семейства MIC, блокирующие рецепторы NKG2D на мембране NK-клеток, и тем препятствующие их активации.

Опухолевые клетки секретируют цитокины IL-10, TGF- β , а также простагландин E, подавляющие иммунный ответ. Росту опухоли способствует выработка трансформированными клетками ростовых факторов (эпидермального, тромбоцитарного, фибробластного), а развитию стромы - сосудистого ростового фактора.

При росте опухоли активируются регуляторные Т-клетки (естественные, индуцированные), которые секретируют IL-10, TGF- β . Гистологические исследования выявили скопления регуляторных Т-клеток в окружении опухоли, в региональных лимфатических узлах. Регуляторные Т-клетки супрессируют иммунный ответ, а именно функцию эффекторных Т-лимфоцитов.

Поиск возможностей усиления противоопухолевого иммунитета направлен на повышение иммуногенности опухолей и на стимуляцию эффекторных механизмов. Такой способ повышения эффективности иммунного ответа был предложен в 70-х годах 20 века, когда стали использовать адьюванты на основе микобактерий (вакцина БЦЖ), а также *Corinebacterium*

parvum. Результаты лечения оказались неоднозначными, однако с современных позиций направление было выбрано правильно, так как осуществлена попытка усилить иммуногенность опухолевых клеток добавлением ПАМП, т.е. сформировать полноценный антигенный стимул. Продолжением этого направления в настоящее время стали попытки создания противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток, нагруженных опухолевыми антигенами и индуцированных на повышение их активности и снижению толерогенности. В настоящее время используются или разрабатываются такие подходы к иммунотерапии опухолей как цитокиноterapia, использование препаратов моноклональных антител, иммунотоксина на основе моноклональных антител, иммуноцитотерапия, применение лечебных онковакцин.

По распространенности среди опухолей мочевыделительной системы рак мочевого пузыря (РМП) занимает 2-е место, а среди всех злокачественных новообразований - 9. Ежегодно диагностируется около 356 тысяч новых случаев РМП (Parkin D.M. et al., 2005, Ploeg M. et al., 2009). РМП составляет 3,1% общей смертности от злокачественных новообразований у мужчин и 1,8% у женщин.

Более 90% опухолей мочевого пузыря составляют переходно-клеточные карциномы, 5% - плоскоклеточные карциномы и менее 2% - аденокарциномы (Kaufman D.S., et.al., 2009). По классификации, принятой ВОЗ в 2004г., уротелиальные опухоли разделяют на 4 категории: папиллярную, уротелиальную опухоль с низким злокачественным потенциалом, уротелиальный рак низкой (low grade carcinoma) и высокой степени злокачественности (high grade carcinoma). По классификации TNM, утвержденной в 2002г. Международным противораковым союзом, выделяют 4 стадии в зависимости от степени повреждения или инвазии в мочевой пузырь (Kaufman D.S., et.al., 2009). Примерно 70% вновь диагностируемых случаев переходно-клеточного РМП представлено поверхностными опухолями (стадии

Ta, T1) или преинвазивными карциномами (Tis), при этом 50–70% из них рецидивируют и около 10–20 % прогрессируют до стадий T2–T4 - инвазии в мышечный слой, окружающие ткани. У пациентов со стадией Ta и высокой степенью дифференцировки опухоли 15-летняя выживаемость без прогрессии опухоли составляет 95%. При аналогичной стадии заболевания, но низкой степени дифференцировки опухоли выживаемость составляет 61%, а при стадии T1- уже 44%.

В последнее время большое внимание уделяется поиску молекулярно-генетических маркеров РМП (Заболотнева А.А. с соавт., 2011, O' Donoghue P.M. et al, 2010). В первую очередь это связано с быстрым развитием методов, позволяющих обнаружить функциональные и структурные генетические изменения. Главный недостаток существующих панелей молекулярных биомаркеров РМП - их низкая чувствительность.

Выделяют следующие группы биомаркеров:

1. Молекулы РНК, по-разному представленные в норме и при РМП;
2. Маркеры метилирования ДНК;
3. Маркеры геномной нестабильности;
4. Биохимические маркеры, специфические для мочи или крови больных РМП.

В настоящее время получены данные о генах, по-разному экспрессированных в нормальных и опухолевых клетках мочевого пузыря. Интегральный анализ этой информации позволит не только обнаружить значимые для диагностики гены, но и объяснить механизмы развития болезни, определить прогноз ее течение и назначить адекватную терапию.

На основе обнаруженных дифференциальных генов создаются панели маркеров, потенциально применимые в клинической практике (табл.2). В частности, в моче больных РМП зафиксированы повышенные уровни мРНК для генов сурвивина, гиалуронидазы, теломеразы, цитокератина, цитокератина 8 и 18 и виментина. Однако, диагностические панели характеризуются

невысокой чувствительностью. По-видимому, это связано с тем, что наиболее специфические и чувствительные маркерные молекулы пока еще не обнаружены.

Таблица 2

Неинвазивные диагностические тесты для обнаружения РМП

Тест	Маркер	Чувствительность, %	Специфичность, %
Цитологическая диагностика	Опухолевые клетки, обнаруживаемые в моче	7-17 для высокодифференцированных опухолей, стадии Ta-T1; 53-90 - для низкодифференцированных	90-98
BTA Stat и BTA TRAK	Антиген, связанный с РМП (bladder tumor antigene)	50-80	50-75
NMP-22	Ядерный белок, высвобождаемый при апоптозе	50 - для неинвазирующих опухолей; 90 - для инвазирующих	70-85
ImmunoCyt	Высокомолекулярные карциноэмбриональные антигены и муцины	50-95	60-85
UroVision (FISH)	Флуоресцентные зонды на хромосомы 3, 7, 17, 9p21	70-100	66-93
FDP	Продукты деградации фибрина	78-90	75-90
CYFRA 21.1	Уровень цитокератина 19	73	41
ГК-ГИ	Уровень гиалуроновой кислоты и гиалуронидазы	86	61

Таблица 2 (продолжение)

Тест	Маркер	Чувствительность, %	Специфичность, %
UBC	Уровень цитокератинов 8 и 18	54	97
СК20	Уровень цитокератина 20	85	76
Survivin	Уровень сурвивина	82	90
LeX	Уровень антигена Льюиса	75	85

Известно, что на экспрессию генов влияет метилирование регуляторных областей ДНК. В промоторных областях многих генов находятся многократно повторяющиеся последовательности CG-динуклеотидов - CpG-островки.

При опухолевом процессе часто имеет место их аномальное метилирование и связанное с этим изменение генной экспрессии (Van Rhijn B.W. et al., 2001). Гипо- или гиперметилирование CpG-островков генов обнаружено при разных типах опухолей, включая РМП. Например, при РМП гиперметилированы промоторные области онкосупрессорных генов *p14 ARF* и *p16 INK4a*, *VHL*, *MLH1*, *RASSF1*, *BCL2*, *DAPK*, *PYCARD* (Knowles M.A., 2008). Метилирование этих локусов иногда обнаруживается и в неопухолетрансформированном уротелии, так, эти процессы усиливаются с возрастом и под действием некоторых внешних факторов, например курения, что влияет на специфичность этого показателя, так как частота встречаемости РМП выше у лиц пожилой возраста.

Цитокератины - белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток. Опухолевая трансформации клеток часто сочетается с

повышением экспрессии цитокератинов. Цитокератины поступают в циркуляцию в виде отдельных частично деградированных белковых фрагментов, формируя растворимые белковые комплексы различных размеров. Цитокератины - маркеры пролиферации опухоли у пациентов с эпителиально-клеточными карциномами. Определение их уровня в сыворотке или моче пациента позволяет проводить раннюю диагностику и мониторинг течения заболевания, дает возможность предсказать развитие метастазов раньше, чем это возможно с помощью традиционных методов (Qu X. et al., 2010) и является надежным дополнительным показателем эффективности терапии. В настоящий момент диагностически значимым считается определение цитокератинов ТРАсуК (СУК8/18), TPS (СУК18) и UBC (Urinary Bladder Cancer). ТРАсуК является антигенной структурой, которая присутствует во фрагментах цитокератина 18. Он попадает в кровь в результате некроза опухолевых клеток, является маркером S, G2 и митотической фаз нормального клеточного цикла, поэтому его концентрация в сыворотке отражает скорость обновления клеток. Определение уровня ТРАсуК используется для дифференциации стабильной и прогрессирующей стадий заболевания, а также для прогнозирования и наблюдения за ходом болезни в процессе лечения пациентов с эпителиально-клеточной карциномой. Повышенные уровни ТРАсуК наблюдаются не только при прогрессировании опухолей, но также при воспалительных состояниях, заболеваниях печени, почечной недостаточности, при диабете и во время беременности. Уровень TPS определяется у пациентов с эпителиально-клеточной карциномами, например, раком молочной железы, простаты, яичников и гастроинтестинальной карциномой. В рутинных исследованиях TPS может использоваться для контроля терапии и наблюдения пациентов после курса лечения. TPS детектируется особенно в высоких концентрациях у пациентов с быстрым метастазированием, определение TPS до лечения имеет прогностическое значение.

Определение UBC в моче является высокоспецифичным тестом для ранней диагностики рака мочевого пузыря (специфичность для начальных стадий T1 и T2 составляет более 80%). Использование маркера позволяет установить стадию заболевания, выбрать адекватное лечение, а также выявить рецидив заболевания задолго до его клинических проявлений.

Профессиональная деятельность пожарных осуществляется в условиях сложной оперативной и тактической обстановки, часто в чрезвычайных ситуациях. Эта работа сопровождается воздействием разнообразных опасных и вредных факторов, высокими физическими и психоэмоциональными нагрузками. В таких ситуациях возрастает риск возникновения аллергических заболеваний, обусловленных воздействием комплекса факторов биологического, химического и физического характера, что также может явиться причиной развития дефектов в системе местного иммунитета слизистых оболочек, нарушению резистентности к вирусным инфекциям. Хронические персистирующие микст-вирусные инфекции с частыми обострениями, вялотекущие сопровождаются активацией механизмов гуморальной и клеточной защиты, в том числе клеток-эффекторов: цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток, осуществляющих как противовирусную, так и противоопухолевую защиту.

План иммунологического обследования включал:

1. Изучение показателей, характеризующих количественные и функциональные особенности клеток-эффекторов, реализующих противовирусную/противоопухолевую защиту, у специалистов ГПС.
2. Исследование в биологических средах уровней опухолеассоциированных маркеров, характеризующихся наибольшей информативностью (высокие специфичность, чувствительность), у пациентов с раком мочевого пузыря для выявления неоплазий и контроля рецидива.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Профессиональная деятельность сотрудников государственной противопожарной службы (ГПС) связана как со стрессом, так и с воздействием неблагоприятных факторов условий труда.

Для определения нарушений в иммунной системе специалистов ГПС, обусловленных профессиональной деятельностью данной категории лиц были обследованы 98 человек с учетом профессиональной нагрузки.

В группу 1 (42 человека) вошли сотрудники специализированной части ГПС в возрасте от 22 до 48 лет. Данная пожарная часть производит выезды на пожары повышенной сложности, аварийные выбросы веществ химической природы, ДТП, глубинные работы.

В группу 2 (56 человек) вошли сотрудники ГПС в возрасте от 25 до 53 лет частей № 7, № 9, № 17, № 36. Данные части производят выезды на все виды пожаров, возникающие на территории города и области.

Материалом для исследований явились цельная кровь и сыворотка крови.

Исследование фенотипического состава НК-клеток периферической крови проводили методом проточной цитометрии (Cytomics FC500, Navios, Beckman-Coulter, США) с применением прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови в многоцветном анализе с использованием моноклональных антител к CD3, CD16, CD56 и соответствующих изотипических контролей (Beckman-Coulter, США) по безотмывочной технологии с применением для лизиса эритроцитов лизирующего раствора Versalyse (Beckman-Coulter, США). В лимфоцитарном гейте анализировали 3000 событий. Выделение лимфоцитарной популяции проводили на основании параметров прямого и бокового светорассеяния.

Цитотоксическую активность НК-клеток исследовали методом проточной ДНК-цитометрии. Оценку цитотоксической активности НК-клеток проводили на выделенных мононуклеарах периферической крови с

использованием в качестве клеток-мишеней клетки линии К-562 на второй день после пересева. Метод основан на разнице модальных чисел хромосом лимфоцитов человека и клеток линии К-562, отличающихся в 1,47 раз. Для учета реакции использовали ДНК-цитометрию. Анализ проб проводили на проточном цитометре EPICS XL (Beckman Coulter). Оценивали ДНК-гистограммы контрольных и опытных проб, анализировали в программе MultiCycle AV ver. 3 (Beckman Coulter). В каждой пробе оценивали 10 тыс. событий. Цитотоксическую активность натуральных киллерных клеток оценивали по формуле и выражали в процентах:

$$\frac{\% \text{ клеток К-562 в фазах G}_2\text{+S в контрольной пробе} - \% \text{ клеток К-562 в фазах G}_2\text{+S в опыте}}{\% \text{ клеток К-562 в фазах G}_2\text{+S в контрольной пробе}}$$

Определяли уровни секреторного иммуноглобулина А (sIgA) и общего иммуноглобулина Е (IgE) в сыворотке крови, sIgA в слюне методом ИФА (Полигност, Россия).

Для изучения целесообразности определения опухолеассоциированных антигенов в биологических средах с целью диагностики РМП и мониторинга рецидивов исследовали уровни опухолеассоциированных антигенов, материалом служили моча и сыворотка крови.

Критериями исключения явились острые или обострение хронических инфекционных заболеваний, заболевания печени, беременность.

При выборе пациентов учитывались данные литературы о повышении уровней сывороточных маркеров TPS и ТРА сук у пациентов с воспалительным процессом, сопровождающимся нарушением целостности слизистых, эритроцитурией, пролиферацией эпителия слизистых.

Обследовано 52 человека, из них 14 женщин, 38 мужчин. Возраст пациентов колебался от 19 до 81 года.

В 1-ю группу (16 человек) вошли пациенты с диагнозом мочекаменная болезнь (МКБ), из них 3 человека в фазе ремиссии, 13 человек с обострением.

У 2-х пациентов с МКБ диагностирован полип почки, у 1-го - полип мочевого пузыря, РМП в анамнезе.

Вторую группу – (32 человек) – группу сравнения – составили пациенты с аденомой простаты (4), с хроническим простатитом в ремиссии (6), с раком простаты (2), хроническим холециститом в ремиссии (1), хроническим пиелонефритом в обострении (6), с хроническим циститом в ремиссии, хроническим пиелонефритом в ремиссии (9), с гематурией, РМП (2), с гематурией, подозрением на РМП (1), с варикоцеле, варикозной болезнью (1). Дополнительно были обследованы 4 пациента с ИППП в анамнезе, получившие адекватную терапию.

Для определения концентрации цитокератинов ТРАсук, TPS осуществляли забор крови из вены в объеме 4-5 мл, кровь центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин. Сыворотку крови замораживали и хранили при температуре минус 18°C. Перед проведением исследования сыворотку размораживали при комнатной температуре.

С целью определения концентрации UBC собирали утреннюю порцию мочи, находившуюся в мочевом пузыре не менее 3 часов. Пробирку с мочой центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин, замораживали и хранили при температуре минус 20 °С. Перед непосредственным проведением анализа образцы мочи размораживали при комнатной температуре.

Уровень сывороточных и уринарного маркеров определяли по методике фирмы изготовителя IDL Biotech AB, Швеция методом иммуноферментного анализа. Чувствительность использованных наборов составила: TPS < 6 u/l, ТРАсук 0,1 ng/ml, UBC 0,1 mkg/l. Нормативные значения в инструкциях к наборам: UBC (моча) менее 10 mkg/l, TPS (кровь) менее 110 u/l, ТРАсук менее 2 ng/ml.

Статистическую обработку результатов исследования проводили в аналитической системе Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Среднее значение цитотоксической активности НК-клеток всех обследованных пожарных стремилось к нижней границе популяционной нормы (табл.3).

Таблица 3

Показатели цитотоксической активности НК - клеток у всех обследованных специалистов ГПС.

Показатель	Специалисты ГПС n=98	Нормативные значения
Цитотоксическая активность НК - клеток (%)	37,2 ±1,51	37 - 44

Количество пожарных, показатели цитотоксической активности НК-клеток которых, соответствовали нормативным значениям, было сопоставимо в обеих группах (табл.4). В сравниваемых группах количество обследованных, цитотоксическая активность НК-клеток которых превышала верхнюю границу нормы, составило 24% и 37%. Это можно объяснить острым воспалением или обострением хронического процесса, чаще вирусной этиологии, с аллергическим компонентом, локализующимся на слизистых, что подтверждается превышающими верхнюю границу нормы показателями гуморального звена (табл. 5,6).

Цитотоксическая активность НК-клеток при частотном анализе была достоверно ниже нормальных значений у 54% пожарных 1 группы и у 40% пожарных 2 группы, что обусловлено не только угнетением синтеза регуляторных медиаторов, опосредующих реализацию киллерного потенциала НК-клетками, но и сочеталось с дисбалансом субпопуляций клеток-эффекторов (табл. 7).

Таблица 4

Показатели цитотоксической активности НК - клеток у специалистов ГПС 1 и 2 групп.

Показатель	Группа 1, % от числа обследованных			Группа 2, % от числа обследованных		
	Норма	Повыше- ние	Сниже- ние	Норма	Повыше- ние	Сниже- ние
Цитотокси- ческая активность НК- клеток (%)	22	24	54	23	37*	40**

*, ** $p < 0,05$ между группами

Таблица 5

Показатели гуморального иммунитета у всех обследованных специалистов ГПС.

Показатель	Специалисты ГПС n=98	Нормативные значения
Общий IgE в сыворотке (МЕ/мл)	138,1±19,5	20-100
sIgA в сыворотке(мг/мл)	6,46±0,51	1,5-3,0
sIgA в слюне (мг/мл)	320,9±18,2	57-260

Таблица 6

Показатели иммунитета у специалистов ГПС 1 и 2 групп.

Показатель	Группа 1, % от обследованных			Группа 2, % от обследованных		
	Норма	Повышение	Снижение	Норма	Повышение	Снижение
Общий IgE в сыв. (МЕ/мл)	67	33	-	66	34	-
sIgA в сыворотке (мг/мл)	27	70	3	21	79	-
sIgA в слюне(мг/мл)	4	83	13	37	59	4

Таблица 7

Сравнительная характеристика субпопуляций НК-клеток в группе пожарных и в контрольной группе

Показатель, %	Пожарные	Референтный интервал
CD3-CD56+CD16+	78,2 ±5,2	80-95
CD3-CD56+ CD16-	15,6±2,8	1,5-8,5
CD3-CD56-CD16+	6,2±2,7	1,4-5

У лиц этой категории было исследовано содержание в крови субпопуляций НК-клеток с фенотипами: CD3-CD56+CD16-, CD3-CD56+CD16+, CD3-CD56-CD16+. Известно, что противовирусной/противоопухолевой активностью обладают клетки с высокой экспрессией

CD16, клетки с высокой экспрессией CD56 характеризуются более выраженным регуляторным и пролиферативным потенциалом.

У пожарных количество «дубль-позитивных» НК-клеток (CD3-CD56+CD16+) сопоставимо с референтными значениями (табл.7).

Изменения субпопуляционного состава НК-клеток характеризовались увеличением как субпопуляции клеток с выраженной регуляторной функцией (CD3-CD56+ CD16-) практически в два раза, так и субпопуляции клеток с максимальным киллерным потенциалом (CD3-CD56-CD16+), увеличение этой популяции было незначительно. Соотношение между субпопуляциями НК-клеток у пожарных составило 2,5 против 1,7 у здоровых лиц.

У пожарных выявлены изменения в распределении популяций НК-клеток в крови по сравнению с контролем: доминирование клеток, с регуляторной функцией, т.е. синтезирующих цитокины, над клетками с максимальным киллерным потенциалом.

Таким образом, в группе пожарных снижение функциональной активности НК-клеток сочеталось с минорной долей клеток с выраженной противовирусной/противоопухолевой активностью.

Превышение верхнего предела референтного интервала цитокератинов TPS и ТРАсуК в сыворотке выявлено у 11 пациентов 1 группы с МКБ в фазе обострения, что составило 69% от числа обследованных этой группы. Показатели TPS у пациентов 1 группы с МКБ в фазе обострения равнялись 202.2 ± 57.99 u/l (референтный интервал менее 110 u/l), ТРАсуК 4.16 ± 1.5 ng/ml (референтный интервал менее 2 ng/ml). Особенностью пациентов этой группы явилось сочетанное повышение в сыворотке обоих цитокератинов.

Повышенный уровень УВС в моче в сочетании с высоким содержанием в сыворотке ТРАсуК и TPS (превышение значения верхнего референтного интервала более чем в 3 раза) имел место у пациентки 1-ой группы с

обострением МКБ и РМП в анамнезе, рецидивирующим полипом мочевого пузыря.

Средние значения ТРАсуК по группе сравнения составили 1.14 ± 0.09 ng/ml, значение TPS также были в пределах нормы. Только у одного пациента второй группы с диагнозом: Хронический пиелонефрит, ремиссия, МКБ (в анамнезе) имело место повышение сывороточного цитокератина ТРАсуК (2,5 ng/ml).

Показатели цитокератинов ТРАсуК, TPS в сыворотке, уровни которых у пациентов с обострением МКБ превышали верхнюю границу нормы, могут увеличиваться при различных воспалительных заболеваниях. Повышенные уровни цитокератинов в крови - белков промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток, например: ТРАсуК, который является в том числе маркером S, G2 и митотической фаз нормального клеточного цикла, свидетельствует не только о эпителиально-клеточных карциномах, но и воспалительном процессе, сочетающемся с нарушением целостности слизистых мочевыделительных путей, отражает процессы репарации поврежденной ткани. По данным литературы, высокие уровни TPS также определяются у пациентов с эпителиально-клеточными карциномами (рак молочной железы, простаты, яичников, при гастроинтестинальной карциноме).

У пациента с МКБ в обострении и сопутствующей болезнью Крона, осложненной гемоколитом, показатели цитокератинов ТРАсуК, TPS в сыворотке превышали верхние референтные интервалы более чем в 3 раза.

Таким образом, ТРАсуК, TPS не являются высокоспецифичными для РМП. Однако, высокие уровни этих цитокератинов, по-видимому, особенно TPS, являются основанием для более углубленного обследования пациентов и динамического наблюдения.

Повышенные уровни мочевого онкогенного пептида (UBC) (референтный интервал менее 10 mkg/l) в моче выявлены у 3-х пациентов

группы сравнения, из них у 2-х РМП: у пациента П., 49 лет с диагнозом: РМП, МКБ, гиперплазия простаты 1-2 ст., болезнь Бехтерева и у пациента П., 55 лет с диагнозом: РМП (низкодифференцированный переходноклеточный рак мочевого пузыря T2bN0M0). У пациента П., 55 лет с диагнозом: РМП (низкодифференцированный переходноклеточный рак мочевого пузыря T2bN0M0) высокий уровень мочевого онкогенного пептида UBC сочетался с высокими значениями ТРАсуК и ТРС в сыворотке, у пациента П. 49 лет был значимо повышен только уровень UBC.

У пациента с эритроцитурией, подозрением на РМП уровень UBC в моче превышал верхнюю границу нормы в 8 раз, но значения ТРАсуК и ТРС в сыворотке были в пределах нормативных значений, пациент обследуется.

Таким образом, несмотря на немногочисленность выборки, по данным нашего исследования значимо повышенный (в 6-50 раз выше референтных значений) уровень UBC в моче был выявлен у всех (100%) пациентов с установленным диагнозом рака мочевого пузыря. В группе сравнения высокий уровень UBC в моче был выявлен у 3-ех человек (8,3%), у двоих из которых гистологически подтвержденный РМП, третий пациент обследуется с подозрением на РМП. У пациентки 1-ой группы с РМП в анамнезе и рецидивирующим полипом мочевого пузыря и МКБ высокий уровень UBC в моче может свидетельствовать о возможном рецидиве РМП, пациентка обследуется.

Клинический случай.

Пациент П., 55 лет, поступил в клинику ВЦЭРМ на отделение урологии 21.01.2013. для планового оперативного лечения.

Из анамнеза известно, что 8 августа 2012г. была выполнена радикальная цистэктомия с илеоцистопластикой по Shtuder (низкодифференцированный переходноклеточный рак мочевого пузыря T2bN0M0).

В декабре 2012г. отметил появление примеси крови в моче, была произведена цистоскопия, в области неовезикоуретрального анастомоза по задней полуокружности определяется ворсинчатое образование на широком основании размерами до 1см в диаметре. Выполнена биопсия новообразования. По данным гистологического исследования - инфильтративная уротелиальная карцинома низкой степени дифференциации (G3).

23.01.13 была выполнена операция - трансуретральная резекция рецидива уротелиальной карциномы неовезико-уретрального анастомоза. Послеоперационный период протекал спокойно.

На контрольной цистоскопии, выполненной через шесть недель, данных за рецидив опухоли не получено.

В августе 2013г. пациент вновь госпитализирован на урологическое отделение с жалобами на боли в поясничной области слева. При обследовании выявлена стриктура нижней трети левого мочеточника, гидронефроз II ст. слева, 03.08.13 - произведена перкутанная пункционная нефростомия слева, 13.08.13 - выполнено наложение уретероцистонеоанастомоза слева. Послеоперационный период протекал гладко.

Впоследствии стал отмечать усиливающиеся боли в поясничной области с обеих сторон, не связанные с положением тела и активным движением. На фоне приема НПВС улучшения не отмечал.

В октябре 2013г. вновь госпитализирован на урологическое отделение для обследования. Объективно пациент отмечает снижение веса за последние несколько месяцев.

При цитологическом исследовании мочи опухолевых клеток не обнаружено.

Произведена контрольная цистоскопия - данных за рецидив опухоли не получено.

Уровень УВС в моче в октябре 2013г. составил 115 мкг/л (N до 10 мкг/л).

По данным МСКТ от октября 2013г. органов брюшной полости и забрюшинного пространства определяются:

- признаки сужения дистальной трети левого мочеточника на уровне анастомоза.
- Mts - поражение лимфатических узлов (забрюшинных паравазальных на уровне L2-L4, подвздошных, межгрудного слева).
- Mts - поражение L1, L4, L5, S2 позвонков.

В дальнейшем пациенту показано проведение химиотерапии на основе цисплатины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных литературы и собственных данных позволил определить иммунологические показатели, наиболее информативные для характеристики противоопухолевой защиты у специалистов опасных профессий. К таким показателям относятся: количество клеток-эффекторов (цитотоксические Т-лимфоциты, натуральные киллерные клетки), реализующих киллерную функцию в отношении опухолевых клеток, параметры цитотоксической активности, гуморальные факторы, активирующие цитотоксическую функцию клеток-эффекторов. В сочетании с иммунологическими показателями целесообразно определять в биологических средах уровни опухолеассоциированных маркеров, характеризующиеся высокой информативностью (высокие специфичность, чувствительность).

У пациентов с предопухолевыми и опухолевыми заболеваниями мочевого пузыря необходимо проводить мониторинг этих показателей до оперативного лечения и на фоне проводимой терапии с учетом гистологического варианта опухоли, стадии дифференцировки, стадии опухолевого процесса, соматического статуса пациента.

Результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод, что исследование цитокератинов является дополнительным диагностическим критерием для выявления наличия опухолевого процесса – рака мочевого пузыря. Наибольшей специфичностью характеризуется такой показатель как уринарный цитокератин UBC. При оценке значений уровней сывороточных цитокератинов необходимо учитывать, что их уровни могут повышаться при воспалительных процессах, сочетающихся с нарушением целостности слизистых оболочек, пролиферации эпителия слизистых, а также при эпителиально-клеточных карциномах другой локализации, т. е. сывороточные цитокератины ТРАсуk и TPS могут быть информативными только при повторных определениях в комплексе с предложенными иммунологическими показателями.

Алгоритм предоперационного обследования и лабораторного мониторинга после оперативного лечения должен включать:

1. Определение количественных характеристик клеток-эффекторов, осуществляющих противоопухолевую защиту.
2. Оценку функциональной активности клеток-эффекторов - цитотоксическую функцию.
3. Определение в сыворотке крови уровней опухолеассоциированных антигенов, в том числе при раке мочевого пузыря - уринарного цитокератина UBC.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Имянитов Е.Н. Молекулярные механизмы опухолевого роста // Вопросы онкологии. – 2010. – Т.56, № 2. – С. 117-128.
2. . Клинически значимые морфологические параметры почечно-клеточного рака / Москвина Л.В., Андреева Ю.Ю., Мальков П.Г. [с соавт.] // Онкология – 2013. – №4. – С.34-39.
3. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии // Практическая Медицина – 2006. – С.503.
4. Молекулярные маркеры рака мочевого пузыря: от частного к целому / Заболотнева А.А., Гайфуллин Н.М., Буздин А.А. [с соавт.] // Онкоурология. – 2011. – Т.3. – С. 16-19.
5. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) // М.: «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава РФ, 2012. – 260с.
6. Ярилин А.А. Иммунология. – М.: ГЭОТАР Медиа, 2010. – 749 с.
7. Bukowski R.M. AE-941, a multifunctional antiangiogenic compound: trials in renal cell carcinoma // Expert. Opin. Investig. Drug – 2003. – Vol.12. – P.1403-1411.
8. Cohen H.T., McGovern F.J. Renal-cell carcinoma. // N. Engl. Med. – 2005. – Vol.353, №2. – 2477-2490.
9. .Comparison of virtual cystoscopy and ultrasonography for bladder cancer detection: A meta-analysis / Qu X., Huang X., Wu L. [et al.] // Eur. J. Radiol. 2010. – Vol. 93– P.432-439.

- 10.. Expression of MDR1 (multidrug resistance) gene and its protein in normal human kidney / Ernest S., Rajaraman S., Megyesi J. [et al.] // *Nephron*. – 1997. – Vol. 77. – P.284-289.
- 11.Global cancer statistics, 2002 CA / Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. [et al.] // *Cancer J. Clin.* – 2005. – Vol.55, №2. – P.74–108.
- 12.Gupta P.B., Chaffer C.L., Weinberg R.A. Cancer stem cells: mirage or reality? // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 61. – P.759-767.
- 13.Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. – 2000. – Vol.100. – P.57 – 70.
- 14.Huland E., Heinzer H. Survival in renal cell carcinoma: a randomized evaluation of tamoxifen vs interleukin-2, alpha-interferon (leucocyte) and tamoxifen // *Br. J. Cancer*. – 2000. – Vol.82. – P.246-247.
- 15.IL-2 in combination with IFN-alpha and 5-FU versus tamoxifen in metastatic renal cell carcinoma:long-term results of a controlled randomized clinical trial / Atzpodien J., Kirchner H., Illiger H.J. [et al.] // *Br. J. Cancer* – 2001. – Vol.85. – P. 130-136.
- 16.Interferon-alpha as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma / Motzer R.J., Bacik J., Murphy B.A. [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol.20. – P.89-96.
- 17.Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene / Fojo A.T., Shen D.W., Mickley L.A. [et al.] // *J. Clin.Oncol.* – 1987. – Vol.5. – P.1922-1927.
- 18.Kaufman D.S., Shipley W.U., Feldman A.S. // *Bladder cancer*. – *Lancet*. – 2009. – Vol.374, №9685. – P.239–249.
- 19.Knowles M.A. Molecular pathogenesis of bladder cancer // *Int. J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol.13, №4. – P.287–297.

20. Microsatellite analysis–DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial / Van Rhijn B.W., Lurkin I., Kirkels W.J. [et al.] // *Cancer* – 2001. – Vol.92, №4. – P.768–775.
21. Motzer R.J., Russo P. Systemic therapy for renal cell carcinoma // *J. Urol.* – 2000. – Vol.163. – P.408-417.
22. O' Donoghue P.M., McSweeney S.E., Jhaveri K. Genitourinary imaging: current and emerging applications // *J. Postgrad. Med.* – 2010. – Vol.56, №2. – P.131–139.
23. Oliver R.T.D., Mehta A., Barnett M.J. A phase 2 study of surveillance in patients with metastatic renal cell and assessment of response of such patients to therapy on progression // *Mol. Biother.* – 1998. – Vol.1. – P.14-20.
24. Ploeg M., Aben K.K., Kiemeny L.A. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world // *World J. Urol.* – 2009. – Vol. 27, №3. – P.289–293.
25. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma / Motzer R.J., Bacik J., Schwartz L.H. [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2004. – Vol.22, №3. – P.454-463.
26. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience / Patard J.J., Leray E., Rioux-Leclercq N., Cindolo L. [et. al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol.23, №12. – P.2763-2771.
27. Riley L.B., Desai D.C. The molecular basis of cancer and the development of targeted therapy // *Surg. Clin. North. Amer.* – 2009. – Vol.89. – P.1-15.
28. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease / Janzen N.K., Kim H.L., Figlin R.A., Belldegrun A.S. // *Urol. Clin. North. Amer.* – 2003. – Vol.30, №4. – P.843-852.

29. Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin
McAllister S.S., Gifford A.M., Greiner A.L. [et al.] // Cell – 2008. – Vol. 133. –P.
994-1005.
30. The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations / Demicheli
R., Retsky M.W., Hrushesky W.J. [et al.] // Ann. Oncol. – 2008. – Vol.19. –
P.1821-1828.
31. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for
oxygen-dependent proteolysis / Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W. [et
al.] // Nature. – 1999. – Vol.99. – P.271–275.
32. Vogelzang N.J., Priest E.R., Borden L. Spontaneous regression of histologically
proved pulmonary metastases from renal cell carcinoma: a case with 5-year
follow-up // J. Urol. – 1992. – Vol.148. – P.1247–1248.
33. Weinderg R.A Mechanisms of malignant progression // Carcinogenesis – 2008. –
Vol.29. – P.1092-1105.