

УДК 616.5 – 006.81 – 085.37

ВПЛИВ РІЗНИХ СХЕМ ІНТЕРФЕРОНОТЕРАПІЇ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ЛІМФОЦИТІВ У ХВОРИХ НА МЕЛАНОМУ ШКІРИ

ФІЛЬЧАКОВ Ф.В., ШУМІЛІНА К.С., ЛЬОН Г.Д., КУКУШКІНА С.М., КОРОВІН С.І., КУКУШКІНА М.М.

Національний інститут раку, м. Київ

Меланома шкіри за рівнем захворюваності посідає друге місце серед новоутворень шкіри, проте вона обумовлює 75 % випадків смерті від злоякісних новоутворень цієї локалізації. За даними Національного онкологічного реєстру України [1] в 2008 році загальна кількість випадків меланоми шкіри складала 2731, що спричинило 1113 випадків смерті. Результати лікування хворих на меланому шкіри залишаються незадовільними через раннє метастазування, швидке прогресування і низьку чутливість пухлинних клітин до хіміопрепаратів. 5-річна виживаність складає від 90 % при I стадії до (1-4)% при IV стадії захворювання. Головною і в той же час дуже складною для вирішення проблемою ефективного лікування цієї категорії хворих є запобігання розвитку метастазів. Оскільки меланому вважають імунозалежною пухлиною, для терапії хворих на цю недугу застосовують різноманітні імунотерапевтичні підходи, зокрема, використання інтерферонів [2-4], інтерлейкіна-2 [5], фактора некрозу пухлини [6], вакцинотерапії [7]. На сьогоднішній стандарт профілактичної терапії хворих з I-III стадіями меланоми шкіри залишається інтерферонотерапія [8], проте за даними деяких авторів її ефективність складає (16-48) % [9-11]. Вдосконалення існуючих схем застосування інтерферону- α (ІФН- α) проводиться, як шляхом зміни доз та режимів введення, так і доповнення існуючих стандартів іншими цитокинами, одним з яких є інтерферон- γ (ІФН- γ). Врахування особливостей відповіді організму на біотерапію є необхідним аспектом її проведення. Саме тому вивчення впливу різних схем інтерферонотерапії на проліферативну відповідь лімфоцитів та експресію активаційних маркерів на лімфоцитах периферичної крові хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри стало метою наших досліджень.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

Характеристика хворих. В дослідження було включено 26 хворих з гістологічно підтвердженим діагнозом первинно-локалізованої меланоми шкіри ІВ-ІІС стадії, які надали письмову поінформовану згоду участі в дослідженні. Серед пацієнтів було 10 чоловіків та 16 жінок; середній вік хворих склав 54,1 роки (від 31 до 72 років). Також було обстежено 35 практично здорових людей в тій же віковій групі.

Шляхом рандомізації хворі були розподілені на контрольну (13 хворих) та основну (13 хворих) групи (рис.1). Представлений дизайн дослідження включає режими застосування інтерферонів у хворих досліджуваних груп та етапи отримання матеріалу для імунологічних досліджень. Хворим контрольної групи було розпочато курс ад'ювантної терапії рекомбінантним ІФН- α 2b (Лаферобіон, підшкірно по 3 млн. МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс) через 8-10 діб після хірургічного видалення первинної пухлини. Хворі основної групи через 8-10 діб після операції отримували курс рекомбінантного ІФН- γ (Інгарон («Фармаклон», Російська Федерація), підшкірно по 500 тис. МО через день, 5 ін'єкцій), після якого проводили курс терапії із застосуванням рекомбінантного ІФН- α 2b (Лаферобіон, підшкірно по 3 млн. МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс).

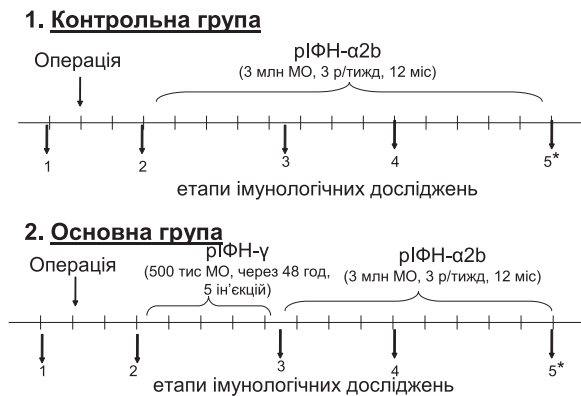


Рис. 1. Дизайн дослідження

За період спостереження зразки крові від кожного хворого отримано 4 рази: 1 етап – безпосередньо перед оперативним втручанням; 2 – до початку курсу ІФН- γ (основна група) або ІФН- α 2b (контрольна група); 3 – після курсу ІФН- γ (основна група) або після 5 ін'єкцій ІФН- α 2b (контрольна група); 4 – через 3 міс від початку курсу терапії ІФН- α 2b. Імунологічні дослідження після проведення повного курсу лікування (5 етап) – продовжуються.

Проведення досліджень було схвалено локальною комісією з питань етики Національного інституту раку МОЗ України.

Методи досліджень. Мітоген-індуковану проліферацію лімфоцитів периферичної крові до-

сліджували в реакції бласттрансформації з фітогемаглютиніном (ФГА) морфологічним методом. Для цього із стерильно взятої венозної гепаринізованої крові (20 Од/мл гепарину («Біохемі», Австрія)), витриманої при кімнатній температурі (30-40) хв до чіткого розділення еритроцитів та плазми, відбирали лейкоконцентрат. Контрольні проби (об'єм 1,0 мл) містили: 100 мкл лейкоконцентрату та 900 мкл повного культурального середовища (ПКС, складається з середовища RPMI 1640 («Sigma», Німеччина), 80 мкг/мл гентаміцину («Львівтехнофарм», Україна) та 10 % інактивованої фетальної телячої сироватки («Sigma», Німеччина)). Дослідні проби (об'єм 1,0 мл) містили: 100 мкл лейкоконцентрату, 900 мкл ПКС та 10 або 20 мкг ФГА («Sigma», Німеччина). Інкубацію проб здійснювали упродовж 72 год при 37°C у вологій атмосфері 5% CO₂. Після інкубації клітини осаджували шляхом центрифугування упродовж 5 хв при 200 g. Супернатант відбирали, а до осаду клітин додавали по краплях 2,0 мл 20% спиртового розчину оцтової кислоти, постійно перемішуючи вміст пробірок. Через 5 хв клітини осаджували шляхом центрифугування упродовж 10 хв при 200 g. Супернатант відбирали, залишаючи в пробірці мінімальну кількість рідини (50-100 мкл). Осад ретельно перемішували і клітинну суспензію переносили на промарковане предметне скло. Мазки висували при кімнатній температурі та фарбували за Романовським-Гімзою. В мазках підраховували відсотковий вміст бласттрансформованих клітин серед лімфоцитів.

Імунофенотип лімфоцитів визначали методом проточної цитофлуориметрії [12, 13] з використанням моноклональних антитіл (МКАТ) до CD4, HLA-DR та CD95, мічених флуоресцеїнізотіоціанатом («Сорбент», Росія), CD25, мічених фікоеритринціаніном-5, CD127 та CD69, мічених фікоеритрином, («Beckman Coulter», США).

Для визначення кількості регуляторних Т-лімфоцитів (Трег) використовували багатопараметричний аналіз з багатоетапним введенням логічних обмежень. Трег виявляли серед CD4⁺-лімфоцитів за наявністю високої експресії CD25 в поєднанні з низькою та негативною експресією CD127 (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low-neg}) [14-16].

МКАТ з гепаринізованою кров'ю у співвідношенні 1:5 інкубували у темряві упродовж 30 хв при температурі (20-25)°C; додавали 2,0 мл лізуючого розчину та витримували 10 хв в тих же умовах. Потім клітини двічі відмивали забуференим ізотонічним розчином NaCl (ЗФР) та фіксували 1% розчином параформальдегіду. Результати підраховували на проточному цитофлуориметрі FACScan («Becton Dickinson», США) з використанням програми «Cell Quest». Гейт популяції клітин встановлювали на підставі комбінації прямого та бокового світлорозсіювання

[17]. Під час обліку результатів підраховували 2×10³ клітин при визначенні основних популяцій лімфоцитів та 10×10³ – при визначенні мінорної популяції – Трег.

Статистичні методи. Статистична обробка отриманих даних проведена із використанням Excel (MS Office 2003, XP) та програми STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США). Результати дослідження представляли у вигляді медіани та значень 10 та 90% квантилів у дужках. Для визначення вірогідності розбіжностей (p) показників незалежних груп застосовували критерій Манна-Уїтні, розбіжностей показників групи в динаміці лікування – одновибірковий критерій Уїлкоксона [18,19]. Розбіжності оцінювали як вірогідні при p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження *in vitro* мітоген-індукованої активації лімфоцитів периферичної крові у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри обох досліджуваних груп показало, що характер реакції в залежності від концентрації ФГА на всіх етапах обстеження співпадає з такою у практично здорових людей (табл.).

Як видно з даних, наведених в таблиці, до початку лікування у хворих контрольної та основної груп реєструється вірогідне зниження (p < 0,01) відсотка бласттрансформованих клітин у відповідь на ФГА у концентрації 10 мкг/мл до 12,5 (3,0; 32,0) та 13,5 (7,0; 43,5) відповідно при порівнянні з показником у ПЗЛ (30,0 (6,0; 63,3)%). Проте, реакція лімфоцитів на ФГА у концентрації 20 мкг/мл не відрізняється від такої у практично здорових людей.

Після видалення первинної пухлини (2 етап) у хворих обох досліджуваних груп спостерігається тенденція до відновлення мітоген-індукованої проліферації лімфоцитів у відповідь на ФГА (у концентрації 10 мкг/мл), про що свідчить відсутність розбіжностей між цими величинами та показниками у практично здорових людей. В той же час, при індивідуальному аналізі було встановлено, що після оперативного втручання у 6 з 13 хворих контрольної та 7 з 13 хворих основної групи мітоген-індукована активація лімфоцитів знизилась відносно вихідних значень.

У хворих основної групи після проведеного курсу терапії ІФН-γ (3 етап) спостерігається зниження активності реакції бласттрансформації лімфоцитів під впливом ФГА у концентрації 10 мкг/мл до рівня (16,0 (0; 30,1)%, що значно нижче за показники у практично здорових людей (30,0 (6,0; 63,5) %). При індивідуальному аналізі з'ясувалось, що у всіх хворих цієї групи після ад'ювантного курсу ІФН-γ досліджуваний показник зменшувався відносно вихідного рівня незалежно від того, в який бік змінювалась активність мітоген-індукованої

реакції лімфоцитів після видалення пухлини. У хворих контрольної групи після 5 ін'єкцій ІФН- α 2b (3 етап) спостерігаються аналогічні зміни імунореактивності: у 100% випадків відбувається зниження відсотка бласттрансформованих лімфоцитів в присутності ФГА у концентрації 10 мкг/мл (6,0 (1,0; 26,0) %, проти 30,0 (6,0; 63,5) % у практично здорових людей ($p < 0,005$), проте їх рівень статистично не відрізнявся від вихідного.

Застосування упродовж 3 міс ІФН- α 2b у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри супроводжувалось різноспрямованою зміною реактивності лімфоцитів крові на мітоген *in vitro*, що пов'язано з включенням в схему терапії ІФН- γ (табл.).

Застосування упродовж 3 міс ІФН- α 2b у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри супроводжувалось різноспрямованою зміною реактивності лімфоцитів крові на мітоген *in vitro*, що пов'язано з включенням в схему терапії ІФН- γ (табл.).

Таблиця

Рівень мітоген-індукованої активації лімфоцитів крові (за результатами РБТЛ, % бласт) на етапах лікування хворих на меланому шкіри

Групи	Концентрація ФГА	Етапи дослідження			
		1	2	3	4
контрольна	10 мкг/мл	12,5 (3,0; 32,0) $p_1 < 0,01$	12,0 (0; 52,5)	6,0 (1,0; 26,0) $p_1 < 0,005$	1,5 (1,0; 2,0) $p_1 < 0,02$ $p_2 < 0,01$
	20 мкг/мл	61,3 (18,0; 79,8)	52,0 (15,3; 78,0)	59,0 (6,0; 67,0)	38,0 (18,0; 52,0) $p_2 < 0,01$
основна	10 мкг/мл	13,5 (7,0; 43,5) $p_1 < 0,01$	24,8 (3,5; 59,5)	16,0 (0; 30,1) $p_1 < 0,01$	30,0 (5,0; 67,0) $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$
	20 мкг/мл	53,5 (24,0; 36,0)	66,0 (8,0; 86,0)	56,0 (45,5; 86,0)	82,3 (46,0; 95,0) $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$
практично здорові люди	10 мкг/мл	30,0 (6,0; 63,5)			
	20 мкг/мл	59,5 (30,0; 87,5)			

- Примітки:** 1. p_1 - розбіжність при порівнянні з відповідним показником у практично здорових людей статистично вірогідна;
2. p_2 - розбіжність при порівнянні з показником до операції статистично вірогідна;
3. p_3 - розбіжність при порівнянні з відповідним показником в контрольній групі статистично вірогідна.

Як видно, у хворих основної групи, що послідовно отримували ІФН- γ та ІФН- α 2b (4 етап), спостерігалось суттєве збільшення відсотка бласттрансформованих лімфоцитів до 30,0 (5,0; 67,0) (при концентрації ФГА 10 мкг/мл) та 82,3 (46,0; 95,0) (при концентрації ФГА 20 мкг/мл), що в обох випадках суттєво перевищувало вихідний рівень ($p < 0,01$) та не відрізнялось від показника у практично здорових людей. Навпаки, на цьому етапі у пацієнтів контрольної групи, що отримували лише ІФН- α 2b, відповідь лімфоцитів на мітоген була найнижчою за весь період спостереження і складала 1,5 (1,0; 2,0)% (при концентрації ФГА 10 мкг/мл) та 38,0 (18,0; 52,0)% (при концентрації ФГА 20 мкг/мл), що в обох випадках було суттєво нижче показника до операції ($p < 0,01$). На цьому етапі дослідження відмінності в імунореактивності хворих основної та контрольної груп виявились також значними: лімфоцити пацієнтів, що послідовно отримували ІФН- γ та ІФН- α 2b, мали значно вищий показник мітоген-індукованої активації у порівнянні з таким у пацієнтів, що отримували тільки ІФН- α 2b ($p < 0,01$).

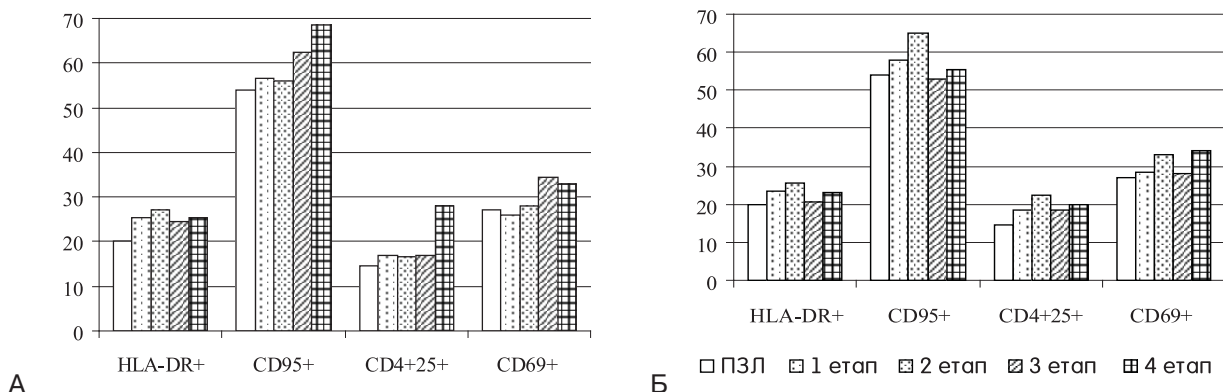
Таким чином, застосування ІФН- α 2b в ад'ювантному режимі у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри призводить до зниження мітоген-індукованої активації лімфоцитів *in vitro* (через 3 міс від початку інтерферонотерапії), проте послідовне застосування ІФН- γ та ІФН- α 2b супроводжується її вірогідним збільшенням не тільки порівняно з вихідним рівнем, але й з показниками у хворих контрольної групи.

В результаті аналізу експресії поверхневих маркерів активації лімфоцитів периферичної крові на етапах інтерферонотерапії (рис. 2) було встановлено, що до початку лікування у хворих обох досліджуваних груп вірогідно збільшена ($p < 0,05$) відносна кількість лімфоцитів, що експресують HLA-DR, та активованих Т-хелперів із рецептором до ІЛ-2 ($CD4^+CD25^+$) при порівнянні з подібними показниками у практично здорових людей. 3-місячний курс ІФН- α 2b, проведений хворим контрольної групи (3-4 етапи), не призводить до зниження відносної кількості HLA-DR $^+$ -лімфоцитів, а у хворих основної групи після курсу ІФН- γ відсоток HLA-DR $^+$ -лімфоцитів знижується до норми, проте після 3 міс терапії ІФН- α 2b реє-

струється значно вищим за фізіологічні значення ($p < 0,05$). У хворих обох досліджуваних груп відносна кількість активованих Т-хелперів зберігається на підвищеному рівні ($p < 0,05$) упродовж всього терміну спостереження.

Разом з тим, відносна кількість лімфоцитів, що експресують CD95- та CD69-антигени, на початковому етапі досліджень практично не відрізнялася від норми (рис. 2). У хворих контрольної групи кількість лімфоцитів, що експресують рецептор апоптозу (CD95), перевищувала межу норми після 5 ін'єкцій ІФН- $\alpha 2b$ і зберігалася на

підвищеному рівні до кінця спостереження ($p < 0,05$). В той же час, у хворих основної групи відносна кількість CD95⁺-лімфоцитів після операції вірогідно збільшувалась, а після курсу ІФН- γ (3 етап) та 3-місячного курсу ІФН- $\alpha 2b$ – зменшувалась до значень, що суттєво нижчі аналогічних в контрольній групі ($p < 0,05$). Підвищена експресія маркера ранньої активації лімфоцитів (CD69) відбувалася у хворих контрольної групи після 5 ін'єкцій ІФН- $\alpha 2b$, а у хворих основної групи – після хірургічного лікування та після 3-місячного курсу ІФН- $\alpha 2b$.

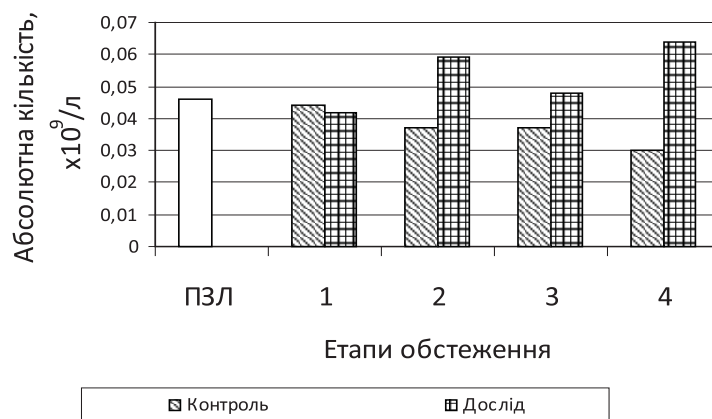


* – розбіжність при порівнянні з показником практично здорових людей статистично вірогідна ($p < 0,05$);
 • – розбіжність при порівнянні з показником в контрольній групі статистично вірогідна ($p < 0,05$);
 ПЗЛ – практично здорові люди

Рис.2. Відносний вміст (%) активованих лімфоцитів в крові хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри в динаміці інтерферонотерапії (А – контрольна група, Б – основна група)

Визначення кількості Трег в периферичній крові хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри показало, що на початковому етапі до-

сліджень вона не виходить за межі фізіологічних значень (рис. 3).



* – розбіжність при порівнянні з показником практично здорових людей статистично вірогідна ($p < 0,05$);
 • – розбіжність при порівнянні з показником в контрольній групі статистично вірогідна ($p < 0,05$);
 ПЗЛ – практично здорові люди.

Рис.3. Абсолютний вміст Трег в крові хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри в динаміці інтерферонотерапії

Як видно з даних, наведених на рис.3, суттєві зміни кількості Трег в порівнянні з практично здоровими людьми відбуваються через 3 міс від початку терапії ІФН- $\alpha 2b$ (4 етап): у

хворих контрольної групи абсолютна кількість Трег зменшується до 0,03 (0,026; 0,035) x 10⁹ /л на тлі вірогідного зменшення загальної кількості лімфоцитів, у хворих основної групи –

збільшується до 0,064 (0,032; 0,191) $\times 10^9$ /л при незмінній загальній кількості лімфоцитів, причому величина показника Трег в основній групі вірогідно перевищує таку в контрольній ($p < 0,05$). Незважаючи на відсутність вірогідних відмінностей від початкового рівня, в основній групі (послідовне введення ІФН- γ та ІФН- $\alpha 2b$) спостерігається тенденція до збільшення абсолютної кількості Трег в процесі інтерферонотерапії, а в контрольній (тільки ІФН- $\alpha 2b$) – тенденція до її зменшення.

Узагальнюючи отримані дані, можна стверджувати, що послідовне застосування ІФН- γ та ІФН- $\alpha 2b$ у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри посилює мітоген-індуковану активацію лімфоцитів *in vitro* та асоціюється із зростанням абсолютної кількості Трег в периферичній крові. В той же час, застосування тільки ІФН- $\alpha 2b$ супроводжується суттєвим зниженням проліферативної відповіді лімфоцитів на мітоген *in vitro* та тенденцією до зменшення кількості Трег. Наші дані суперечать раніше отриманим даним Е.К.Олейник та співавт. [20] про зворотну залежність рівня проліферативної відповіді лімфоцитів та вмісту Трег у онкологічних хворих. Проте, цей суперечливий факт можна пояснити різницею у методичному підході визначення кількості Трег. Автори оцінювали вміст CD25⁺ клітин, серед яких субпопуляція Трег визначалась нами більш детально за фенотипом (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low-neg}).

Послідовне застосування ІФН- γ та ІФН- $\alpha 2b$ також супроводжувалось підвищеною експресією на лімфоцитах периферичної крові маркера ранньої активації CD69, проте застосування тільки ІФН- $\alpha 2b$ не сприяло збільшенню його експресії. Рівень експресії маркера пізньої активації HLA-DR залишався стабільно високим упродовж всього терміну спостереження незалежно від застосованої схеми інтерферонотерапії. Інтерферонотерапія також не спричинила суттєвого впливу на активовані хелпери (CD4⁺25⁺), відносна кількість яких перевищувала фізіологічні значення упродовж всього терміну спостереження. Експресія рецептора, що опосередковує апоптоз (CD95), суттєво збільшувалась на етапах застосування ІФН- $\alpha 2b$, вірогідно перевищуючи рівень в основній групі на аналогічних етапах дослідження.

ВИСНОВКИ

1. Послідовне застосування ІФН- γ та ІФН- $\alpha 2b$ в ад'ювантному режимі у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри збільшує проліферативну відповідь лімфоцитів периферичної крові на мітоген *in vitro*, а застосування тільки ІФН- $\alpha 2b$ вірогідно зменшує її;

2. Послідовне застосування ІФН- γ та ІФН- $\alpha 2b$ або тільки ІФН- $\alpha 2b$ в ад'ювантному режимі суттєво не впливають на експресію активіційних маркерів/антигенів на лімфоцитах периферичної крові хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри; застосування тільки ІФН- $\alpha 2b$ суттєво збільшує (на відміну від ІФН- γ + ІФН- $\alpha 2b$) експресію антигену, що опосередковує апоптоз (CD95).

ЛІТЕРАТУРА

1. Рак в Україні, 2008 – 2009. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби / Авт. : З.П. Федоренко, А.В. Гайсенко, Л.О. Гулак [та ін.] // Бюл. Національного канцер-реєстру України. – К., 2010. – № 11. – 112 с.
2. Hauschild A, Volkenandt M, Tilgen W, et al. Efficacy of interferon alpha 2a in 18 versus 60 months of treatment in patients with primary melanoma of >1.5 mm tumor thickness: a randomized phase III DeCOG trial. [2008 ASCO Meeting abstract 9032]. *J Clin Oncol.* 2008;26(15S):9032.
3. Ascierto P.A., Kirkwood J.M. Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. *J Transl Med.* 2008;6:62.
4. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis// *J Natl Cancer Inst.* 2010. V.102, № 7. P. 493-501.
5. Eton O., Legha S., Buzaid A. et al. Phase 3 randomized trial of Cisplatin, Vinblastin and Dacarbazine plus IL-2 and INF vs CVD in patients with metastatic melanoma// *Prot.ASCO 2000*; № 19. – Abstr.2174.
6. Grunhagen D., Wit J., Hagen T. Technology Insight: utility of TNF- α -based isolated limb perfusion to avoid amputation of irresectable tumors of the extremities// *Nature Clin. Pract. Oncol.* – 2006. – V. 3, № 2. – P. 94-103.
7. Lopez M.N., Pereda C., Segal G. Prolonged survival of dendritic cell – vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor / *J. Clin. Oncol.* – 2009. – V.27, № 6. – P. 945-952.
8. Adjuvant therapy with high-dose interferon alpha 2b in patients with high-risk stage IIB/III melanoma / J.M. Kirkwood, A.A. Tarhini, S.J. Moschos, M.C. Panelli // *Nat. Clin. Pract. Oncol.* – 2008. – V.5, № 1. – P. 2–3.
9. Keilholz U, Punt CJ, Gore M, et al. Dacarbazine, cisplatin and interferon- α -2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized Phase III trial (18951) of the European Organization for Research and

- Treatment of Cancer Melanoma Group. /J. Clin. Oncol. 2005; (23): 6747-55.
10. Eton O., Legha S.S., Bedikian A.Y., et al. Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a Phase III randomized trial./ J. Clin. Oncol. 2002; (20): 2045-52.
 11. Atkins M.B., Lee S., Flaherty L.E., et al. A prospective randomized Phase III trial of concurrent biochemotherapy (BCT) with cisplatin, vinblastine, dacarbazine (CVD), IL-2 and interferon alpha-2b (IFN) versus CVD alone in patients with metastatic melanoma (E3695). An ECOG-coordinated intergroup trial./ Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2003; (22): 708.
 12. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека / Б. В. Пинегин, А. А. Ярилин, А. В. Симонова [и др.] : пособие для врачей-лаборантов. – М., 2001. – 55 с.
 13. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение / под ред. С.В. Хайдукова, А.В. Зурочки. – Челябинск, 2008. – 195 с.
 14. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺Treg cells / W. Liu, A.L. Putman, Z. Xu-Yu [et al.] // J. Exp. Med. – 2006. – V. 203, N7. – P. 1700–1711.
 15. Expression of interleukin(IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells / N. Seddiki, B. Santner-Nanan, J. Martison [et al.] // J. Exp. Med. – 2006. – V. 203, N7. – P. 1693–1700.
 16. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, А.А. Тотолян, В.А. Черешнев // Мед. иммунол. – 2009. – Т. 11, № 2–3. – С. 227–238.
 17. Хайдуков С.В. Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофенотипирования. Настройка цитометров и подготовка протоколов для анализа // Мед. иммунол. – 2007. – Т. 9, № 6. – С. 569 – 574.
 18. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К. : Морион, 2001. – 408 с.
 19. Мінцер О.П., Вороненко Ю.В., Власов В.В. Оброблення клінічних і експериментальних даних у медицині. Кн. 5: Навч. посіб. // Інформаційні технології в охороні здоров'я і практичній медицині: У 10 кн. / Під ред. О.П. Мінцера. – К.: Вища школа., 2003. – 350 с.
 20. Олейник Е.К., Олейник В.М., Назаров П.Г., Моисеенко В.М. Снижение индуцированной митогенами поликлональной активации

лимфоцитов периферической крови как параметр иммуносупрессии при различных опухолях человека// Вопросы онкологии. – 2007. – Т.53, № 1. – С. 49-53.

РЕЗЮМЕ

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ ИНТЕРФЕРОНОТЕРАПИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

Фильчаков Ф.В., Шумилина Е.С., Лен А.Д., Кукушкина С.Н., Коровин С.И., Кукушкина М.Н.

Национальный институт рака, г. Киев

Исследовано влияние различных схем интерферонотерапии на функциональную активность лимфоцитов периферической крови у 26 больных первично-локализованной меланомой кожи в динамике комбинированного лечения. Показано, что последовательное применение у этих больных ИФН-γ и ИФН-α2b в адьювантном режиме сопровождается усилением пролиферативного ответа лимфоцитов периферической крови на митоген *in vitro*, в то время, как применение только ИФН-α2b – достоверным снижением его. Последовательное использование ИФН-γ и ИФН-α2b либо только ИФН-α2b в адьювантном режиме не оказывают существенного влияния на экспрессию активационных маркеров на лимфоцитах периферической крови; применение только ИФН-α2b существенно увеличивает (в отличие от ИФН-γ + ИФН-α2b) экспрессию антигена, опосредующего апоптоз (CD 95).

Ключевые слова: первично-локализованная меланома кожи, ИФН-γ, ИФН-α2b, функциональная активность лимфоцитов

SUMMARY

INFLUENCE OF VARIOUS INTERFERON-THERAPY SCHEMES ON LYMPHOCYTES' FUNCTIONAL ACTIVITY IN SKIN MELANOMA PATIENTS

Fil'chakov F.V., Shumilina E.S., Lon A.D., Kukushkina S.N., Korovin S.I., Kukushkina M.N.

National cancer institute, Kiev

The influence of various schemes of interferon-based therapy on peripheral blood lymphocytes' functional activity in 26 primarily-located skin melanoma patients in the dynamics of combined treatment is investigated. It is shown, that consecutive carrying out for these patients an adjuvant gamma-interferon (γIFN) and alpha2b- interferon (α2bIFN) results in the increase of peripheral blood lymphocytes mitogenic-induced proliferation *in vitro*, while carrying out only α2bIFN – decrease it level (p < 0.05). Consecutive use of γIFN and α2bIFN or use of only α2bIFN in an adjuvant regimen do not have essential influence on the activation of antigen expression in peripheral blood lymphocytes; carrying out only adjuvant α2bIFN essentially increases (in contrast to γIFN+α2bIFN) the expression of the antigen of apoptosis (CD 95).

Key words: primarily-located skin melanoma, gamma-interferon, alpha2b- interferon, lymphocytes' functional activity