На правах рукописи

Леснидзе Эдуард Эдуардович

ВЛИЯНИЕ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ НА ВЫДЕЛЕНИЕ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИМИ КЛЕТКАМИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

14.00 16 – патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Чита – 2002

Из фондов Российской национальной библиотеки

Работа выполнена на кафедре нормальной физиологии ГОУ Читинская государственная медицинская академия

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор **Ю.А. Витковский**

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук, профессор **В.В. Альфонсов**
кандидат медицинских наук, доцент **В.А. Широков**

Ведущая организация:
Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии МЗ РФ, (г Санкт Петербург)

Защита диссертации состоится «21»_____2002 г в _____часов на заседании диссертационного совета Д 208 118 01 при ГОУ Читинская государственная медицинская академия (672090, г Чита, ул Горького, 39-А)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ Читинская государственная медицинская академия (672090, г Чита, ул Горького, 39-А)

Автореферат разослан «26»_____2002 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук **Ю.Р. Агапова**

Из фондов Российской национальной библиотеки

2004-4
22271

470769

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. К настоящему времени накоплено много сведений о состоянии гемостаза у больных онкологическими заболеваниями на системном уровне При онкологическом процессе рано выявляются выраженные изменения в системе гемостаза, связанные с поступлением продуктов распада тканей, экспрессией тканевого фактора макрофагами, продукцией провоспалительных цитокинов и др Полученные факты свидетельствуют о том, что у таких пациентов развивается ДВС-синдром. Установлено, что чем тяжелее протекает опухолевый процесс, тем выраженнее проявляются сдвиги в иммунитете и гемостазе (Баркаган З С , 1988-1995; Кузник Б.И. и соавт., 1982, 1988, 1989, Kwaan H C , 1996 и др.).

Однако до сих пор подробно не рассматривались местные процессы, связанные с функцией не только опухолевых, но и опухоль-инфильтрирующих клеток Локальные механизмы включают целый комплекс иммунокомпетентных клеток и большое число молекул цитокинов, выступающих регуляторами не только в противоопухолевой защите, но и порой способствующих прогрессированию неопластического процесса Гемостаз, иммунитет и неспецифическая резистентность организма составляют единую интегральную клеточно-гуморальную систему защиты, в которой цитокины выполняют связующую роль (Кузник Б И и соавт , 1983-2001; Цыбиков Н.Н и соавт., 1983-1988; Витковский Ю.А , 1991 - 2001).

В последнее время для лечения злокачественных новообразований внедряются лекарственные формы цитокинов Для этих целей успешно себя зарекомендовали ИЛ-2, ИЛ-12, ИФα2a, ИФα2b и др (Lopetz M et al., 1993;Atzpodien J et al , 1995; Marincola F.M et al , 1995; Wang J et al , 1996; Han D et al ,1997, Tejedor M et al., 2000; Ye J et al., 2000).

Наиболее привлекательным из всего семейства цитокинов в качестве регулятора естественной противоопухолевой защиты является интерлейкин-2 Молекулы ИЛ-2 являются ключевым звеном, определяющим развитие гуморального и клеточного иммунитета (Кетлинский С.А, Симбирцев А.С., Воробьева А А , 1992). ИЛ-2 продуцируется Т-хелперами 1-го клона в ответ на антигенную стимуляцию Он направленно влияет на рост, дифференцировку и активацию Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, олигодендроглиальных клеток, эпидермальных клеток Лангерганса. От его присутствия зависит развитие цитолитической активности натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов Интерлейкин-2 вызывает образование лимфокин-активированных киллеров и активирует опухоль-инфильтрирующие клетки Эти обстоятельства позволяют цитокину эффективно влиять на многие звенья иммунитета при развитии злокачественных опухолей Препараты интерлейкина-2 могут использоваться в качестве простых внутривенных вливаний, а также применяться в адоптивных методах лечения Противоречивый

Российская национальная библиотека

характер результатов применения цитокинов связан в первую очередь с неизученными до конца механизмами их влияния на клетки эффекторы, участвующими не только в иммунных реакциях, но и регулирующие состояние системы гемостаза Гемостаз, как известно, выступает как один из основных механизмов в противоопухолевой защите организма Также до сих пор не существует принципов цитокинотерапии, а применение, в частности ИЛ-2, при злокачественных новообразованиях является малоизученным вопросом

В связи с вышесказанным изучение патогенетических механизмов влияния цитокинов на опухоль-инфильтрирующие клетки, разработка показаний для применения препаратов и поиски контроля за цитокинотерапией является актуальной задачей современной медицины

Цель исследования. Целью настоящего исследования явилось изучение способности опухоль-инфильтрирующих клеток при раке и гипоплазии легкого оказывать влияние на реакции системы гемостаза.

Нами решались следующие **задачи**

1 Изучить функцию лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии клеток периферической крови и выделенных из лимфатических узлов, пораженных опухолевым процессом, у больных раком легкого и лимфатических узлов пациентов с гипоплазией легкого

2 Исследовать в коагуляционных и фибринолитических тестах среду роста клеток полученных из лимфоузлов больных раком и гипоплазией легкого.

3 Проследить влияние ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ 2, ИЛ-4, ИЛ-8 ИЛ-10, ФНОα in vitro на способность культуральной среды клеток, полученных из лимфоузлов больных раком и гипоплазией легкого, изменять свертывание крови и фибринолиз.

4 Обосновать применение рекомбинантного ИЛ-2 (ронколейкина) у больных раком легкого и оценить его влияние на способность опухоль-инфильтрирующих клеток образовывать коагрегаты с тромбоцитами Проследить действие среды роста опухоль-инфильтрирующих клеток, выделенных после цитокинотерапии. на свертывание крови и фибринолиз

Научная новизна.

1 Впервые установлено, что у больных раком легкого резко тормозится способность лимфоцитов периферической крови, а также клеток, выделенных из пораженных опухолевым процессом лимфатических узлов, к адгезии с тромбоцитами

2 Обнаружено, что среда роста клеток, выделенных из лимфоузлов больных гипоплазией легкого, в присутствии ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10 усиливает гемокоагуляционные реакции, протекающие по внутреннему пути образования протромбиназы, а при одновременном воздействии ИЛ-2 и

Из фондов Российской национальной библиотеки

ИЛ-4 – по внешнему пути формирования протромбиназы Присутствие в окружающей среде только ИЛ-4 или совместно с ИЛ-2 тормозит реакции внутреннего пути, а ИЛ-2 и ИЛ-10 – внутреннего и внешнего пути образования протромбиназы. При этом клетки под влиянием ИЛ-1α, ИЛ-4, ФНОα, а также сочетания ИЛ-2 + ИЛ-4 активируют фибринолиз, а ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-10 и сочетания ИЛ-2 + ИЛ-10 – тормозят его

3 Выявлено, что культуральная среда опухоль-инфильтрирующих клеток при раке легкого на фоне ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-8 активирует, а ИЛ-4, ИЛ-10, а сочетания ИЛ-2 и ИЛ-10 - тормозит свертывание крови по внешнему пути образования протромбиназы В присутствии ФНОα среда роста таких клеток стимулирует, а ИЛ-4 и ИЛ-2 совместно с ИЛ-10 тормозят внутренний путь образования протромбиназы Клетки, полученные от больных раком легкого, под влиянием ИЛ-1α, ИЛ-1α, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНОα, и сочетания ИЛ-2 с ИЛ-4 продуцируют в окружающую среду вещества, тормозящие фибринолиз, а в случае одновременного присутствия ИЛ-2 и ИЛ-10 – стимулирующие лизис фибринового сгустка

4 Доказано, что использование рекомбинантного ИЛ-2 (ронколейкина) у больных раком легкого усиливает лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию клеток периферической крови и опухоль-инфильтрирующих клеток, а также их способность активировать свертывание крови и тормозить фибринолиз

Практическая ценность работы. Применение ронколейкина у больных раком легкого позволяет улучшить течение послеоперационного периода в результате повышения функции иммунной системы Предложены лабораторно-клинические критерии для курса терапии ронколейкином

Внедрение в практику. Результаты работы внедрены в лечебную практику Читинской областной клинической больницы и использованы в учебном процессе на кафедрах нормальной физиологии с курсом клинической физиологии, госпитальной хирургии и онкологии Читинской государственной медицинской академии

Апробация диссертации. Материалы работы представлены на врачебной конференции Читинской областной клинической больницы (Чита, 2000), на совместном заседании кафедр нормальной физиологии с курсом клинической физиологии, патологической физиологии, госпитальной хирургии и онкологии

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, иллюстрирована 28 таблицами и 12 рисунками Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 2 глав собственных исследований, обсуждения полученных данных, выводов и списка литературы, включающего 225 источников (63

отечественных и 162 зарубежных)

Положения, выносимые на защиту:

1 У больных раком легкого на фоне нарушений клеточного и гуморального иммунитета резко тормозится способность лимфоцитов периферической крови, а также клеток, выделенных из пораженных опухолевым процессом лимфатических узлов, к адгезии с тромбоцитами

2 Среда роста клеток, выделенных из лимфоузлов больных гипоплазией легкого, в присутствии ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ 8, ИЛ-10 усиливает гемокоагуляционные реакции, протекающие по внутреннему пути образования протромбиназы, а при одновременном воздействии ИЛ 2 и ИЛ 4 – по внутреннему пути формирования протромбиназы Присутствие в окружающей среде только ИЛ-4 или его совместно с ИЛ-2 тормозит реакции внутреннего пути, а ИЛ-2 и ИЛ-10 – внутреннего и внешнего пути образования протромбиназы При этом клетки под влиянием ИЛ 1α, ИЛ-4, ФНОα, а также сочетания ИЛ-2 + ИЛ-4 активируют фибринолиз, а ИЛ-1α, ИЛ-2, ИЛ-10 и сочетания ИЛ 2 + ИЛ-10 – тормозят его

3 Культуральная среда опухоль инфильтрирующих клеток при раке легкого на фоне ИЛ 1α, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-8 активирует, а ИЛ-4, ИЛ-10, и сочетания ИЛ-2 и ИЛ-10 - тормозит свертывание крови по внешнему пути образования протромбиназы В присутствии ФНОα среда роста таких клеток стимулирует, а ИЛ-4 и ИЛ-2 совместно с ИЛ-10 тормозят внутренний путь образования протромбиназы Клетки, полученные от больных раком легкого, под влиянием ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ 2, ИЛ 8, ИЛ-10, ФНОα и сочетания ИЛ-2 с ИЛ 4 продуцируют в окружающую среду вещества, тормозящие фибринолиз, а в случае одновременного присутствия ИЛ-2 и ИЛ 10 – стимулирующие лизис фибринового сгустка

4 Использование рекомбинантного ИЛ-2 (ронколейкина) у больных раком легкого усиливает лимфоцитарно тромбоцитарную адгезию клеток периферической крови и опухоль-инфильтрирующих клеток Под влиянием ронколейкина увеличивается ответ культивируемых опухоль-инфильтрирующих клеток активировать механизмы внешнего пути образования протромбиназы и вызывать торможение фибринолиза

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе со здоровыми людьми и больными раком желудка, пищевода и легкого соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki (1964, 2000 ред)

Нами обследовано 21 больных раком легкого обоего пола в возрасте от 45 до 65 лет В работе исследованы группы больных с одинаковым гистологическим подтверждением опухоли (умеренно дифференцированный плос-

Из фонда Российской национальной библиотеки

коклеточный рак) и примерно одинаковой клинической стадией процесса $T_2N_1M_0$ У пациентов до радикального хирургического вмешательства не проводилось сеансов лучевого лечения и химиотерапии Для некоторых исследований (лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия) в качестве группы сравнения использованы больные раком желудка (10 чел) и пищевода (10 чел) Контролем служили 10 больных, оперированных по поводу гипоплазии легкого

Больным опытной группы наряду с хирургическим лечением применяли ронколейкин Препарат назначали в разовой дозе 500000 ЕД в 400 мл 0,9% раствора хлорида натрия, медленно, внутривенно, капельно Ронколейкин вводили под контролем теста лейкоцитарно-тромбоцитарной адгезии

В работе использован метод DBM (Double Blind Method), в соответствии с которым выделены две контрольные группы В первой из них после операции проводилось медикаментозное лечение по обычной схеме, исключая лучевое и химиотерапию Среди пациентов второй контрольной группы применялось плацебо

Полученные данные сравнивались с результатами исследований, проведенных с использованием лимфатических узлов 14 больных гипоплазией легкого и крови 30 здоровых доноров в возрасте от 18 до 40 лет.

Методы определения количества иммунокомпетентных клеток

Подсчет общего числа лейкоцитов проводили стандартным методом в камере Горяева Мазки крови фиксировали метанолом в течение 10 мин и окрашивали по Романовскому Гимза Подсчет клеток крови осуществляли под иммерсионным объективом ×90, окуляр ×15

Выделение иммунокомпетентных клеток. Способ 1 (из крови). Для получения общего пула лимфоцитов свежую гепаринизированную кровь человека, разбавленную в 2 раза средой 199 наслаивали на урографин-фикол (плотность 1,077) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 минут. После центрифугирования интерфазное кольцо, содержащее лимфоциты, забирали пастеровской пипеткой Полученную клеточную взвесь трижды отмывали средой 199 и готовили взвесь лимфоцитов нужной концентрации, в зависимости от поставленной цели.

Способ 2 (из лимфатических узлов и опухоли). Лимфатические узлы и кусочки опухоли забирали в стерильных условиях во время радикальной хирургической операции у пациентов, помещали в стерильную среду 199 с добавлением антибиотиков (пенициллин, стрептомицин) и транспортировали в лабораторию в термостатированных условиях В стерильном боксе вскрывали флаконы с лимфатическими узлами и кусочками опухоли, помещали в стерильные чашки Петри и механически измельчали в среде 199 при 37°С Тремя порциями свежей среды 199 вымывали опухоль-инфильтрирующие клетки, а также клетки интактных или пораженных метастазами

Из фондов Российской национальной библиотеки

лимфатических узлов Клетки ресуспендировали, наслаивали на градиент фикол-урографин (плотность 1,076) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 минут После этого получали клетки интерфазного кольца, трижды промывали средой 199 и подвергали культивированию в зависимости от поставленной цели

Часть суспензии клеток наносили на предметные стекла, сушили, фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому-Гимза

Определение субпопуляций лимфоцитов. Субпопуляции лимфоцитов определяли методом непрямой поверхностной иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител ТОО "МедБиоСпектр" (Москва) (Барышников А Ю , 1990)

Оценка лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. Способ 1. Определение показателя лимфоцитарно тромбоцитарной адгезии, относящегося к функциональным тестам оценки иммунокомпетентных клеток, проводили по методу, предложенному Ю А Витковским и соавт (1999) Свежую, гепаринизированную кровь обследуемых больных наслаивали на градиент урографин-фикол (плотность 1,077) и выделяли лимфоциты как описано выше Собирали интерфазное кольцо, содержащие клетки и кровяные пластинки, однократно промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4) и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3-4 мин Надосадочную жидкость сливали, осадок микроскопировали в камере Горяева Подсчитывали число лимфоцитарно тромбоцитарных коагрегатов на 100 клеток

Способ 2. К суспензии иммунокомпетентных клеток, выделенных из опухоли и лимфатических узлов, добавляли аутологичную плазму, богатую тромбоцитами в соотношении 1 1 Смесь инкубировали в течение 30 минут, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2,5 минут и микроскопировали в камере Горяева Подсчитывали число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов на 100 клеток

Определение уровней иммуноглобулинов. Иммуноглобулины классов A, M, G у больных людей определяли методом радиальной иммунодиффузии (Манчини G ,1965) В качестве образца для сравнения использовали стандартные сыворотки с известным содержанием иммуноглобулинов

Лизосомально-катионный тест (ЛКТ). Мазки крови, приготовленные из скарифицированного пальца руки, высушивали при комнатной температуре и окрашивали по методу В Е Пигаревского и соавт (1981) в 0,1% забуференном спиртовом растворе зеленого прочного с pH 8,2 в течение 20 минут Дополнительную окраску мазков проводили 0,25% водным раствором азура А Окрашенные препараты промывали дистиллированной водой, высушивали на воздухе и микроскопировали с использованием масляной иммерсии

При исследовании просматривали 100 гранулоцитов Внутриклеточное

Из фонда Российской национальной библиотеки

содержание катионных белков крови оценивали полуколичественно по величине среднего цитохимического коэффициента (СЦК)

Определение концентрации цитокинов. Для определения концентрации цитокинов (ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-8, ФНОα, ИФα, ИФγ) использовали наборы реагентов ТОО "Цитокин" (г Санкт-Петербург) Измерение уровня цитокинов проводили методом твердофазного ИФА с помощью двойных антител и применением пероксидазы хрена (КФ 1 11 1 7) В качестве стандарта для сравнения в каждой реакции служили рекомбинантные ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-8, ФНОα, ИФα, ИФγ, входящие в состав набора По данным титрования стандартных образцов строили калибровочные графики для каждого из цитокинов, по которым определяли концентрацию ИЛ-1α, ИЛ-1α, ИЛ-8, ФНОα, ИФα, ИФγ в опытных образцах сыворотки или плазмы

Методы культуры клеток. Клетки, выделенные из опухоли и лимфатических узлов в количестве 2×10^6/мл культивировали в среде 199 при температуре 37°С в условиях 5% насыщения атмосферы углекислым газом в течение 24 часов Перед культивированием суспензия клеток была разделена на несколько аликвот В каждую из частей клеток вносили цитокины в следующей дозировке· ИЛ-1α - 2000 МЕД, ИЛ-1β - 2000 МЕД, ИЛ-2 – 2000 МЕД; ИЛ-8 – 2000 МЕД; ФНОα - 2000 МЕД, ИЛ-4 – 2000 МЕД, ИЛ-10 – 2000 МЕД

После культивирования пробы центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 минут, надосадочную жидкость и клетки исследовали в гемостатических тестах

Методы исследования системы гемостаза. Для исследования гемостаза донорскую кровь из локтевой вены человека набирали широкой иглой в центрифужные силиконированные пробирки с добавлением 3,8 % раствора цитрата натрия в соотношении 1 9 Центрифугированием при 3000 об /мин получали тест-плазму, бедную тромбоцитами.

Перед проведением каждого теста в кюветы с тест-плазмой вносили по 0,1 мл среды роста клеток или суспензии клеток

Для исследования влияния культуры клеток на свертывание крови использовали реактивы и фибринтаймер фирмы Behring (Германия) Коагуляционный гемостаз мы оценивали по следующим тестам время свертывания крови (Lee R J , White P ,1913), время рекальцификации плазмы (Bergerhof H D , Roka L , 1954), АЧТВ (Larrien M J , Weillard C , 1957), протромбиновое (Quick A J., 1943), тромбиновое время (Syrmai E., 1957) Фибринолитическую активность тестировали по времени лизиса эуглобулинового сгустка по Kowarzyk и Buluk (1953)

Статистическая обработка материала. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики для связанных и несвязанных меж-

из фонда Российской национальной библиотеки

ду собой наблюдении и вычислен показатель достоверности различии (Венчиков А И , Венчиков В А , 1974)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Свойства опухоль-инфильтрирующих клеток у больных раком легкого и гипоплазией легкого

Установлено, что при злокачественных опухолях в лимфатических узлах, пораженных метастазами, увеличено содержание макрофагов, Т хелперно индуцирующих клеток и естественных киллеров На этом фоне уменьшено количество клеток, несущих маркеры CD8 + и В-лимфоцитов Последнее может быть связано как с абсолютным их снижением, так и с чрезмерной их активацией, в результате которой уменьшается поверхностная люминесценция, свидетельствующая о трансформации В-клеток в плазматические

В следующей серии экспериментов нами проводился функциональный тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии по методу Ю А Витковского и соавт (1999). Авторами установлено, что в норме способны образовывать лимфоцитарно-тромбоцитарные коагрегаты только Т хелперы, а при стимуляции – NK клетки Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия, по мнению авторов, способствует миграции лимфоцитов в очаг поражения Как установлено нами, среди опухоль-инфильтрирующих клеток преобладают лимфоциты, несущие поверхностные маркеры CD4+ и CD16+ Следовательно, тест позволяет адекватно оценить функциональную активность клеток Указанный тест нами проводился одновременно с лимфоцитами крови и опухоль-инфильтрирующими клетками

Установлено, что среди популяции лимфоцитов, полученных из крови больных, страдающих онкологическими заболеваниями желудка, пищевода и легкого существенно снижается количество клеток, способных образовывать коагрегаты с тромбоцитами Так, их относительное число колеблется от 3,1±0,3% - у больных раком желудка, 3,3±0,3% - у больных раком пищевода, 4,1±0,4% - у больных раком легкого, тогда, как в контрольной группе этот показатель составляет 16,8±2,1% ($p<0,001$)

Одновременно с кровью у онкологических больных падало число таких клеток в опухоли и пораженных метастазами лимфатических узлах Так, при развитии процесса в желудке количество розеткообразующих клеток снизилось до 1,7±0,07%, в пищеводе – 1,5±0,06%, в легкого – 1,7±0,08%, а в интактных лимфоузлах их число достигало 9,1±1,1% ($p<0,001$)

Полученные данные свидетельствуют о снижении функциональной активности Т-хелперно-индуцирующих клеток и естественных киллеров у больных раком желудка, пищевода, легкого

Известно, что онкологический процесс сопровождается мощными сдвигами в системе иммунитета и гемостаза Эти две системы одновременно

Из фондов Российской национальной библиотеки

включаются в противоопухолевую защиту. Однако до сих пор не изучались свойства опухоль инфильтрирующих клеток относительно системы гемостаза В связи с этим нами исследована прокоагулянтная, антикоагулянтная и фибринолитическая активность клеток, выделенных из лимфатических узлов, пораженных метастазами, полученных во время радикального оперативного вмешательства у больных раком легкого Вместе с этим также изучалось влияние отдельных цитокинов на гемостатические свойства клеток в условиях культуры Опытная группа включала только клетки пациентов, у которых диагностирована T_2-стадия злокачественного роста В качестве контроля служили клетки больных, полученных из лимфатических узлов больных гипоплазией легкого

Наш выбор исследования только клеток, выделенных из лимфатических узлов у пациентов при раке легкого, продиктован следующими обстоятельствами:

1) имеется возможность сравнить один и тот же орган при разных заболеваниях – злокачественная опухоль легкого и гипоплазия легкого;
2) позволяет во время оперативного вмешательства получить лимфатические узлы при различных заболеваниях легкого, что невозможно сделать при раке желудка и пищевода,
3) из лимфатических узлов можно получить достаточное количество иммунокомпетентных клеток для культивирования, причем из пораженных метастазами лимфоузлов извлекаются опухоль-инфильтрирующие - , а из лимфоузлов при гипоплазии легкого – нормальные клетки для сравнения (из ткани легкого при гипоплазии нельзя получить иммунокомпетентные клетки для культуры)

Как установлено, среда роста нестимулированных клеток больных гипоплазией легкого и раком легкого сокращала время рекальцификации плазмы, АЧТВ ($p<0,05$), однако не оказывала своего действия в тестах протромбинового, тромбинового времени и эуглобулинового фибринолиза ($p<0,05$)

Однако внесение в культуру клеток цитокинов во всех сериях эксперимента показало выраженные изменения в изучаемых тестах Так, присутствие ИЛ-1α оказало существенное влияние на результаты тестирования среды роста Протромбиновое время при внесении опытной среды роста резко сократилось и составило 10,5±0,2 сек ($p<0,05$), тогда как эффект контрольной среды клеток при гипоплазии легкого не отличался от интактной (12,4±0,06 с, $p<0,05$) В этих же условиях среда роста клеток больных гипоплазией легкого, наоборот резко сокращала АЧТВ до 42,0±1,1 сек ($p<0,05$), чего не отмечалось в опытной группе. Вместе с этим, среда роста клеток онкологических больных удлиняла тромбиновое время до 18,4±0,1 с (при гипоплазии - 15,9±0,6 с $p<0,05$) и тормозила фибринолиз до 187±1,9 с (при гипоплазии – 97,2±8,3 с, $p<0,05$)

Фонд Российской национальной библиотеки

Присутствие ИЛ-1β оказало более заметное действие на культивируемые клетки. Так, среда роста клеток больных раком легкого вызвала сокращение времени рекальцификации плазмы до 89,2±3,0 с (при гипоплазии – 115,0±3,6 с, p<0,05), протромбинового времени до 9,9±0,3 с (при гипоплазии – 12,4±0,05 с, p<0,05), но мало изменяла АЧТВ – 45,7±1,4 с (при гипоплазии – 41,9±3,6 с, p<0,05). На этом фоне также наблюдалось торможение тромбинового времени – 18,3±0,2 с (при гипоплазии – 17,2±0,1 с, p<0,05) и времени лизиса эуглобулинового сгустка – 158±9,1 с (при гипоплазии – 110±16,9 с, p<0,05). Эти данные свидетельствуют о более высоком биологическом действии ИЛ-1в на опухоль инфильтрирующие клетки по сравнению с его мембранным аналогом - ИЛ-1α.

Подобные эффекты выявлены и в случае воздействия на клетки интерлейкином 2. Однако этот цитокин проявил себя и в культуре клеток больных гипоплазией легкого. Так, и в одном и в другом случаях среда роста вызывала укорочение времени рекальцификации (до 78,2±1,4 с и 73,0±0,5 с соответственно), удлинение тромбинового времени (до 18,8±0,4 с и 19,6±0,8 с соответственно) и торможение эуглобулинового фибринолиза (до 154,0±8,6 с и 155,0±10,8 с соответственно) – при этом показатели между собой статистически не различаются (p<0,05), но имеют существенную разницу с действием интактной среды роста (p<0,05). Тем не менее, среда роста клеток больных раком легкого не изменяла АЧТВ (49,6±0,4 с, по сравнению с интактной, p<0,05), тогда как при гипоплазии легкого сокращала этот показатель до 43,0±1,4 с (p<0,05).

Инкубация клеток в присутствии ИЛ-8 обнаружила разное действие цитокина у больных раком и гипоплазией легкого. Так, среда роста опухоль-инфильтрирующих клеток больных раком легкого в присутствии цитокина вызывала сокращение протромбинового времени до 11,1±0,1 сек против 12,5±0,05 сек (p<0,05), тогда как среда роста клеток, выделенных из лимфоузлов больных гипоплазией, такого эффекта не давала (p<0,05). В тесте АЧТВ обнаружено противоположное явление: среда роста клеток больных гипоплазией резко сокращала время свертывания до 39,4±0,4 сек против 48,7±0,3 сек в контроле (p<0,05), а среда роста опухоль-инфильтрирущих клеток не изменяла время коагуляции (p<0,05). На тромбиновое время существенное действие оказала среда роста клеток больных раком, удлиняя его до 22,8±0,5 сек (16,2±0,2 сек в контроле, p<0,05). Наряду с этим, такая среда роста тормозила лизис эуглобулинов, время которого увеличилось до 158±8,7 мин, тогда как в контроле оно составляло 128±5,5 мин (p<0,05).

Одним из важных провоспалительных цитокинов, обеспечивающих противоопухолевую защиту, является фактор некроза опухолей, который индуцирует апоптоз опухолевых клеток и повышает экспрессию тканевого фактора

Из фондов Российской национальной библиотеки

эндотелиальными клетками, макрофагами и моноцитами. В связи с этими свойствами, мы исследовали действие цитокина in vitro. Оказалось, что только среда роста культуры опухоль-инфильтрирующих клеток вызывает сокращение времени рекальцификации плазмы до 88,0±2,8 сек (контроль – 112,2±2,9 сек, p<0,05), АЧТВ до 41,6±0,4 сек (контроль – 47,3±0,5 сек p<0,05). Одновременно с этим такая среда роста удлиняет тромбиновое время до 18,7±0,4 сек (контроль – 18,7±0,4 сек, p<0,05) и тормозит фибринолиз до 182±2,3 сек (контроль – 128±5,5 сек, p<0,05). Среда культуры клеток, выделенных у больных с гипоплазией не оказывала существенного влияния на показатели коагуляции и влияла только на время лизиса фибринового сгустка, сокращая его до 82,8±2,8 сек (контроль – 123±4,2 сек, p<0,05).

Наряду с провоспалительными цитокинами важное значение в патогенезе онкологических заболеваний играют противовоспалительные цитокины – ИЛ-4 и ИЛ-10. Работами Ю.А.Витковского и соавт. (1999, 2001) в культуре лимфоцитов продемонстрировано их выраженное влияние на коагулирующие свойства крови и фибринолиз. Эти эффекты подавлялись моноклональными антителами против ИЛ-4 и ИЛ-10 и зависели от соотношения в культуре клеток Т- и В-лимфоцитов.

Обнаружено, что внесение ИЛ-4 в инкубационную среду вызывает противоположные предыдущим цитокинам эффекты. Так среда роста клеток, выделенных из лимфоузлов больных гипоплазией и раком легкого, удлиняет время рекальцификации – в первом случае до 155,2±8,6 сек (контроль – 99,8±2,5 сек, p<0,05), а во втором – до 140,0±4,6 сек (контроль – 112,2±2,7 сек, p<0,05). Подобная динамика наблюдалась относительно протромбинового времени при гипоплазии (13,6±0,1 сек против 12,5±0,03 сек в контроле, p<0,05) и раке легкого (13,3±0,04 сек против 12,5±0,05 сек в контроле, p<0,05). Также тормозилась коагуляция плазмы в тесте АЧТВ при нарушении развития легкого (57,4±0,3 сек против 48,7±0,3 сек в контроле, p<0,05) и онкологическом заболевании (55,1±1,9 сек против 47,3±0,5 сек в контроле, p<0,05). Подобно провоспалительным цитокинам под влиянием ИЛ-4 среда роста клеток лимфоузлов при доброкачественном и злокачественном заболеваниях вызывает сильное удлинение тромбинового времени (в опыте - 21,5±0,6 сек и 23,7±0,9 сек, а в контроле – 16,5±0,2 сек и 16,2±0,2 сек соответственно, p<0,05). Однако среда роста клеток в присутствии ИЛ-4 в обоих случаях не оказывала влияния на эуглобулиновый фибринолиз (p<0,05).

Интерлейкин-10 в культуре клеток проявлял несколько иные свойства. Так, среда роста клеток при гипоплазии в опыте резко укорачивала время рекальцификации тест-плазмы до 62,8±3,2 сек против 99,8±2,5 сек в контроле (p<0,05) и АЧТВ до 41,5±0,4 сек против 48,7±0,3 сек в контроле

Репозиторий Национальной библиотеки

($p<0,05$) Среда роста опухоль-инфильтрирующих клеток в присутствии ИЛ-10 вызывала удлинение только протромбинового времени до 15,2±0,1 сек против 12,5±0,05 сек ($p<0,05$) и тромбинового времени до 23,7±0,1 сек против 16,2±0,2 ($p<0,05$) На этом фоне существенно тормозился эуглобулиновый фибринолиз под действием опытной среды роста в одном и другом случаях Так, лизис эуглобулинов среды роста клеток лимфоузлов больных гипоплазией легкого достигал 236±9,0 мин, а раком легкого – 246±8,0 сек, тогда, как в контроле он составлял 123±4,2 сек и 128±5,5 сек соответственно ($p<0,05$)

Учитывая, что ИЛ-4 и ИЛ-10, в основном, оказывают противоположное противовоспалительным цитокинам действие на гемостатические функции культивируемых клеток, мы решили оценить комбинированное влияние на них ИЛ-2 и ИЛ-4 или ИЛ-10

Одновременное присутствие в инкубационной среде ИЛ-2 и ИЛ-4 вызвало разный ответ клеток Так, среда роста клеток из лимфатических узлов при гипоплазии легкого повторяла эффекты ИЛ-2 в тестах времени рекальцификации и протромбинового времени, а в АЧТВ – ИЛ-4, резко удлиняя его ($p<0,05$) В тесте тромбинового времени действие цитокинов нивелировалось и соответствовало контрольным цифрам ($p<0,05$), хотя каждый цитокин по отдельности вызывал его удлинение Однако присутствие обоих интерлейкинов в культуре привело к тому, что среда роста этих клеток активировала лизис эуглобулинов, сокращая его время до 82,8±5,9 мин (в контроле – 123±4,2 мин, $p<0,05$) Среда роста опухоль-инфильтрирующих клеток на фоне ИЛ-2/ИЛ-4 вызывала резкое удлинение времени рекальцификации до 167,0±4,2 сек против 112,2±2,7 сек ($p<0,05$) Этот эффект, вероятно, является суммацией действия ИЛ-4, вызывающего удлинение АЧТВ в опыте до 67,0±4,7 сек против 47,3±0,5 сек в контроле ($p<0,05$) , а также влияния ИЛ-2, увеличивающего тромбиновое время до 20,0±0,7 сек против 16,2±0,2 сек в контроле ($p<0,05$) Одновременно с этим присутствие ИЛ-4 усилило эффект ИЛ-2 в тесте эуглобулинового фибринолиза, в котором время лизиса повысилось до 187±6,0 мин ($p<0,05$)

Комбинация ИЛ-2 и ИЛ-10 вызывала также разный ответ клеток Так, в случае гипоплазии легкого среда роста выявила устранение влияния каждого по отдельности цитокина (гиперкоагуляцию) в тесте времени рекальцификации, которое в опыте статистически не отличалось от контрольных показателей ($p<0,05$) Присутствие обоих цитокинов оказало антикоагулянтный эффект в протромбиновом времени, чего не наблюдалось отдельно для каждого из цитокинов ($p<0,05$) В тесте АЧТВ выявлена подобная картина резкого удлинения времени коагуляции, хотя каждый из цитокинов в среде роста клеток лимфоузлов больных гипоплазией усиливал прокоагулянтное действие Среда роста таких клеток

Из фондов Российской национальной библиотеки

демонстрировала антикоагулянтное действие в тромбиновом времени и торможение фибринолиза, что было характерно для культуры с ИЛ-2 Среда роста опухоль-инфильтрирующих клеток обнаружила антикоагулянтный эффект в тесте времени рекальцификации и протромбиновом времени, характерных для ИЛ-10 (в этих тестах отдельно ИЛ-2 вызывал прокоагулянтный эффект) В тестах АЧТВ и тромбиновом времени такая среда роста несколько уменьшала, хотя и полностью сохраняла, антикоагулянтный эффект, наблюдаемый для каждого из лимфокинов в отдельности Однако на этом фоне присутствие обоих интерлейкинов стимулировало проактиваторное действие среды роста на лизис эуглобулинового сгустка (изолированное внесение ИЛ-10 и ИЛ-2 оказывало тормозящее влияние на фибринолиз)

Резюмируя данные, полученные при исследовании действия различных медиаторов иммунного ответа на клетки, выделенные из лимфоузлов при гипоплазии и раке легкого, можно утверждать, что конечный результат их жизнедеятельности зависит от всей совокупности факторов соотношения клеточного состава, исходного функционального состояния клеток, вида цитокинов и их сочетания

Влияние рекомбинантного ИЛ-2 (ронколейкина) на свойства опухоль-инфильтрирующих клеток больных раком легкого

Установлено, что у больных раком легкого увеличивается общее число лейкоцитов и лимфоцитов по сравнению с показателями здоровых людей На фоне этих изменении у пациентов выявляются изменения в популяционном составе лимфоцитов Так, у больных на фоне резкого снижения общего числа клеток, уменьшается численность основных субпопуляции лимфоцитов Особенно эти нарушения заметны при сравнивании абсолютного числа лимфоцитов У наблюдаемых пациентов особенно выражено проявляются признаки Т-клеточного иммунодефицита во всех группах Иммунологическая недостаточность отмечается среди хелперно-индуцирующих клеток, цитотоксических (киллерных) лимфоцитов и естественных киллеров (основных эффекторов противоопухолевои защиты) Одновременно с этим уменьшается иммунорегуляторный индекс (соотношение CD4+/CD8+) Однако у пациентов, получавших ронколейкин несколько выше содержание CD4+ (Т-хелперов) и CD8+ (цитотоксические/киллерные клетки), чем в остальных группах наблюдения

Одновременно с изменениями Т-клеточного звена, нами отмечены сдвиги в гуморальном иммунитете у больных раком легкого У них на фоне снижения общего числа иммунокомпетентных клеток, уменьшалось количество В лимфоцитов Уровень иммуноглобулинов класса А оказался выше у больных раком легкого, чем у здоровых людей Уровень IgM

Из фондов Российской национальной библиотеки

снижался, а концентрация IgG не имела существенных отличий от здоровых людей

При использовании ронколейкина у пациентов с раком легкого содержание В-лимфоцитов оставалось сниженными, однако их количество превосходило контрольные показатели Концентрация иммуноглобулинов не имела существенных различий по сравнению с контрольной группой больных

Обнаружено, что в нейтрофилах больных раком легкого существенно снижалось содержание лизосомальных катионных белков Однако использование ронколейкина не приводило к существенному увеличению содержания лизосомальных катионных белков в нейтрофилах пациентов

Как показали исследования, у больных раком легкого повышается содержание всех изучаемых цитокинов Так, при развитии опухолевого процесса концентрация ИЛ-1α увеличивается в 6 раз, ИЛ 1β - в 12 раз, ИЛ-8 - в 15 раз, ФНОα - в 60 раз ($p<0,001$) Использование ронколейкина у больных раком легкого вызвало существенное снижение содержания ФНОα (в 2 раза), ИЛ-1β (в 2 раза) от уровня контрольной группы

Таким образом, развитие злокачественной опухоли в легком сопровождается значительной продукцией цитокинов, что свидетельствует о высокой антигенной стимуляции клеток-продуцентов Эти факты позволяют заключить, что «цитокиновая атака» при злокачественном новообразовании мобилизует не только иммунную систему для борьбы с опухолевым процессом, но и сопряженные защитные механизмы.

Приведенные выше данные указывают на имеющиеся выраженные изменения со стороны клеточного и гуморального иммунитета, неспецифической резистентности организма при раке легкого Полученные результаты исследования естественной резистентности являются основанием для проведения иммунокорригирующей терапии у пациентов В случае применения рекомбинантного интерлейкина-2 (ронколейкина) у пациентов эти нарушения проявляются «мягче».

К сожалению, в настоящее время цитокинотерапия является малоизученным видом лечения, поскольку до сих пор не разработаны принципы контроля над ним

В нашей работе в качестве контроля использован тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии Это связано с тем, что у пациентов, болеющих злокачественными новообразованиями, резко снижены функциональные показатели иммунокомпетентных клеток, что отражается на способности лимфоцитов адгезировать к тромбоцитам Более того, работами Ю А.Витковского и соавт (1999) показано, что интерлейкин-2 повышает адгезивные свойства у Т-хелперов и индуцирует такую способность у натуральных киллеров.

Из фондов Российской национальной библиотеки

В специальной серии наблюдений мы сравнили результаты применения ронколейкина у больных раком легкого, желудка и пищевода. Обнаружено, что под влиянием ронколейкина у больных онкологическими заболеваниями по сравнению с исходным уровнем повысилось содержание лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов Более того, число «розеток» под влиянием ронколейкина заметно превысило аналогичный показатель здоровых людей В контрольных группах больных раком желудка пищевода и легкого включая пациентов, получавших плацебо, изменений со стороны адгезивной активности лимфоцитов не выявлено

Таким образом, еще раз подтверждено, что рекомбинантный ИЛ-2 – ронколейкин повышает функциональную активность тромбоцитов в части лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии В связи с этим тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии нами использовался для динамического наблюдения больных, получавших ронколейкин

В отдельной серии экспериментов нами изучена способность опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов выделенных из лимфатических узлов больных гипоплазией и раком легкого, к розеткообразованию с аутологичными тромбоцитами

Установлено, что при гипоплазии легкого показатель лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии лимфоцитов лимфоузлов несколько меньше, чем клеток крови и составляет 9,1±1,1% При раке легкого количество лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов падает до 1,7±0,08% (p_1<0,001), а применение плацебо его не изменяет - 1,6±0,1% (p_1<0,001) Использование ронколейкина в комплексном лечении таких больных повышает показатель ЛТА до 6,8±0,8% (p_1<0,05) Этот факт можно связать со стимуляцией миграции клеток в опухоль, а также повышением их адгезивной способности

Таким образом, использование ронколейкина в комплексном лечении больных злокачественными заболеваниями повышает функциональную активность лимфоцитов, в частности Т-хелперно-индуцирующих клеток и естественных киллеров Это имеет важное патогенетическое значение, ибо онкопротекторная активность этих клеток при развитии злокачественных новообразований существенно снижена В связи с этим использование препарата ИЛ-2 является патогенетически оправданным шагом в терапии опухолевых заболеваний

Нами изучена способность опухоль-инфильтрирующих клеток пациентов, получавших ронколейкин, продуцировать в окружающую среду соединения, влияющие на свертывание крови и фибринолиз

Установлено, что среда роста культивируемых клеток без дополнительного воздействия вызывает укорочение протромбинового времени (до 11,8±0,07 с против 12,5±0,05 в контроле), удлинение тромбинового времени (до 18,2±0,3 с против 16,2±0,2 с) и торможение эуглобулинового

Репозиторий Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета

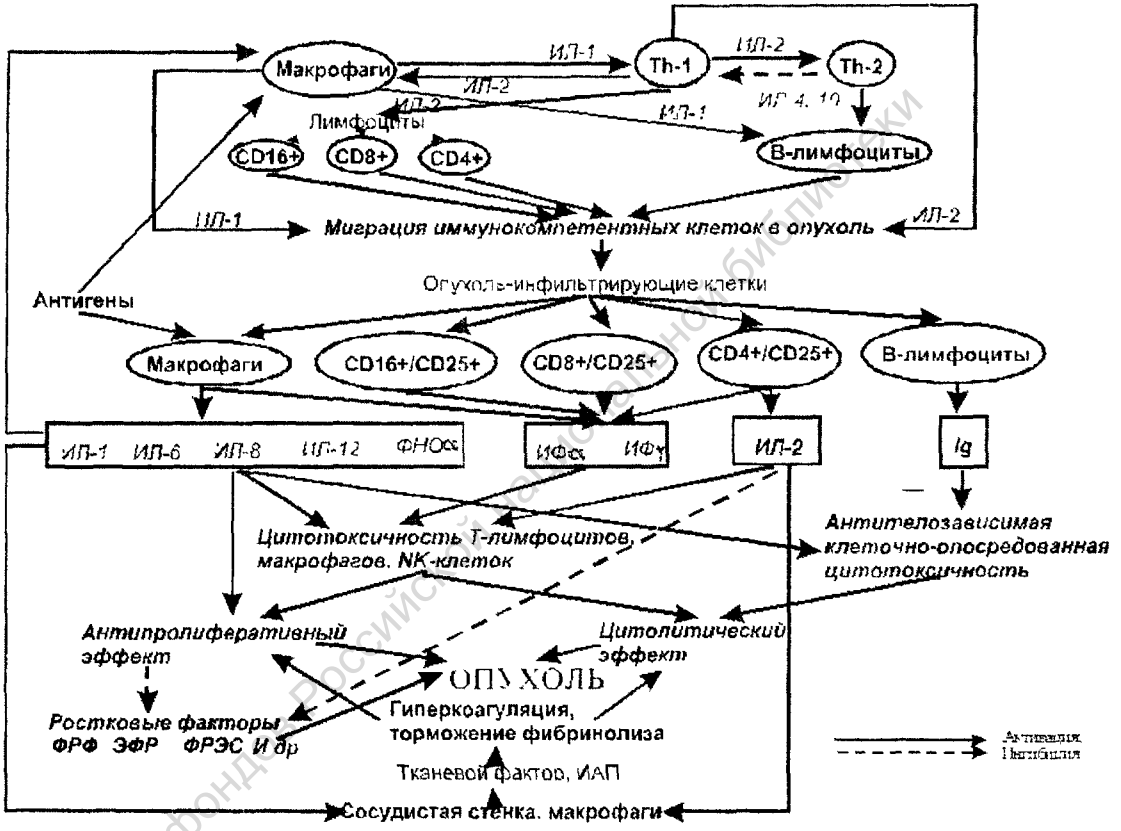

Рис.1. Участие цитокинов в противоопухолевой защите организма.

Из фонда Российской национальной библиотеки

фибринолиза (до 203±9,8 мин против 128±5,5 мин соответственно) Этот ответ клеток отличается от данных, полученных для клеток, пациентов, не принимавших ронколейкин когда среда роста в нестимулированной культуры укорачивала только АЧТВ и удлиняла тромбиновое время

Дополнительное внесение интерлейкина-2 в культуральную среду клеток пациентов, получавших ронколейкин, вызывает более заметное сокращение времени рекальцификации (84,3±4,6 с), протромбинового времени (11,0±0,09 с), при этом остается удлиненным тромбиновое время (18,1±0 5 с) и заторможенным фибринолиз (195±10 2 мин)

Таким образом, использование ронколейкина у больных раком легкого приводит к изменению функционального состояния иммунокомпетентных клеток, при котором изменяется характер их влияния на систему гемостаза

Обнаруженные результаты применения ронколейкина при раке легкого подтверждают, что цитокин способствует более эффективному протеканию механизмов иммунной защиты при болезни, сохранению популяций Т- и В-лимфоцитов, уменьшению продукции эндогенных цитокинов Хотя сдвиги показателей защитных систем организма и не достигали уровня здоровых людей у больных, леченных рекомбинантным интерлейкином-2, однако их выраженность была гораздо меньшей, чем у пациентов, которых вели только с применением базисной терапии Доказательством эффективности такого лечения являются хорошие клинические показатели указывающие на резкое снижение послеоперационных осложнений

Использование рекомбинантной молекулы интерлейкина 2 (ронколейкина) при лечении рака легкого является не только патогенетически оправданным методом лечения в сочетании с базисной терапией, но и средством позволяющим перейти на более высокую ступень в иммунотерапии злокачественных опухолей различной локализации Роль цитокинов в противоопухолевой защите представлена на рис 1

Подводя итог нашим исследованиям, можно заключить, что гемостатические реакции, протекающие локально и на организменном уровне являются важными компонентами противоопухолевой защиты Иммунотерапия, включающая в себя использование цитокинов и адоптивные методы лечения, вызывает изменение параметров функционирования местных защитных механизмов Это сказывается в конечном итоге на выборе стимулированных клеток направления защиты и прогнозе опухолевого роста

ВЫВОДЫ

1 У больных раком легкого на фоне лейкоцитоза, лимфопении, снижения субпопуляций клеток CD4+, CD8+, CD16+ и CD22+, уменьшения со-

Из фондов Российской национальной библиотеки

держания лизосомальных катионных белков в нейтрофилах, повышения концентраций ФНОα, ИЛ-1β, ИЛ-1β, ИЛ-8, резко тормозится способность лимфоцитов периферической крови, а также клеток, выделенных из пораженных опухолевым процессом лимфатических узлов, к адгезии с тромбоцитами.

2 Использование рекомбинантного ИЛ-2 (ронколейкина) у больных раком легкого усиливает лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию клеток периферической крови и опухоль-инфильтрирующих клеток Под влиянием ронколейкина увеличился ответ культивируемых опухоль-инфильтрирующих клеток, усиливающий реакции внешнего пути образования протромбиназы и вызывающий торможение фибринолиза

3 Нестимулированные опухоль инфильтрирующие клетки, выделенные из лимфатических узлов, пораженных метастазами, у больных раком легкого не изменяют свою способность влиять на свертывание крови и фибринолиз по сравнению с клетками, полученными у больных гипоплазией легкого

4 Среда роста клеток, выделенных из лимфоузлов больных гипоплазией легкого, в присутствии ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ 10 усиливает гемокоагуляционные реакции, протекающие по внутреннему пути образования протромбиназы, а при одновременном воздействии ИЛ-2 и ИЛ-4 – по внешнему пути формирования протромбиназы Присутствие в окружающей среде только ИЛ-4 или совместно с ИЛ-2 тормозит реакции внутреннего пути, а ИЛ-2 и ИЛ-10 – внутреннего и внешнего пути образования протромбиназы При этом клетки под влиянием ИЛ-1α, ИЛ-4, ФНОα, а также сочетания ИЛ-2 + ИЛ-4 активируют фибринолиз, а ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-10 и сочетания ИЛ-2 + ИЛ-10 – тормозят его

5 Культуральная среда опухоль-инфильтрирующих клеток при раке легкого под воздействием ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-8 активирует, а ИЛ-4, ИЛ-10, и сочетания ИЛ-2 и ИЛ-10 - тормозит свертывание крови по внешнему пути образования протромбиназы В присутствии ФНОα среда роста таких клеток стимулирует, а ИЛ-4 и ИЛ-2 совместно с ИЛ-10 тормозят внутренний путь образования протромбиназы Клетки, полученные от больных раком легкого, под влиянием ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНОα, и сочетания ИЛ-2 с ИЛ-4 продуцируют в окружающую среду вещества, тормозящие фибринолиз, а в случае одновременного присутствия ИЛ-2 и ИЛ-10 – стимулирующие лизис фибринового сгустка

Из фондов Российской национальной библиотеки

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1 Леснидзе Э Э Прокоагулянтные свойства лимфоцитов лимфатических узлов у больных раком легкого // Актуальные вопросы прикладной медицины Тез докл научно практической конференции – Чита – 2000 – С 116 – 117

2 Леснидзе Э Э Прокоагулянтные свойства опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов // Забайкальский медицинский вестник. – Чита – 2001 - № 1. – С 66 – 67

3 Леснидзе Э Э Влияние рекомбинантного интерлейкина-2 (ронколейкина) на уровень провоспалительных цитокинов при раке желудка // Актуальные вопросы прикладной медицины. Тез докл научно-практической конференции – Чита – 2001 – С 116 – 117 (соавт Рябченко А М)

4 Леснидзе Э Э Влияние рекомбинантного интерлейкина-2 (ронколейкина) на адгезивные свойства опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов // Забайкальский медицинский вестник – Чита – 2001 № 2 – С 69 (соавт Ильиных Л В)

5 Леснидзе Э Э. Влияние цитокинов на коагулологические и фибринолитические свойства клеток лимфатических узлов больных раком и гипоплазией легкого // Читинская гос мед академия – Чита – 2002 – 20 с – Деп в ВИНИТИ 31 01.02, № 179 – В2002

6 Леснидзе Э Э Влияние рекомбинантного интерлейкина-2 (ронколейкина) на иммунитет у больных раком легкого // Читинская гос мед академия – Чита – 2002 – 12 с – Деп в ВИНИТИ 31 01 02, № 180 – В2002

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время,
ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свертывание,
ИЛ – интерлейкин,
ИФ – интерферон;
СЦК – средний цитохимический коэффициент,
ФНО – фактор некроза опухолей;
CD – Claster of Differentiation (дифференцировочный кластер),
DBM – Double Blind Method (двойной слепой метод)

Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

Лицензия ИД №03077 от 23 10 00
Подписано в печать 19.04 02 Бумага офсетная.
Формат 60 x 84 $^{1}/_{16}$ Тираж 100 Заказ №172002.

Отпечатано в иформационно-издательском центре ЧГМА
672090, Чита, ул Горького, 39а

РНБ Русский фонд

2004-4
22271

Из фондов Российской национальной библиотеки

Рос. национальная библиотека в С.Петербурге

08 МАЙ 2002