

ВЛИЯНИЕ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ НА РЕГУЛЯТОРНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

З.Р.Тер-Погосян, Л.Н.Мкртчян, З.А.Караян, Г.А.Давтян,
Л.А.Камалян

*/Онкологический научный центр МЗ Армении/
375052 Ереван, Фанарджяна, 76*

Ключевые слова: поливалентная эмбриональная вакцина, рак молочной железы, Т-хелпер, Т-супрессор

В формировании противоопухолевого иммунитета весьма важна роль регуляторных субпопуляций Т-клеток — Т-хелперов и Т-супрессоров. Т-хелперы распознают опухолевые антигены, выделяют ИЛ-2 — фактор роста Т-клеток, стимулируют дифференциацию сенсibilизированных В-лимфоцитов в плазмocyты — продуценты антител. Выделенные Т-хелперами растворимые факторы специфически стимулируют цитотоксическое действие моноцитов и макрофагов [2,8].

Предметом клинико-экспериментальных исследований явилась поливалентная эмбриональная вакцина (ПЭВ), полученная из эмбрионального органа новорожденных детей по оригинальной методике, разработанной в ОНЦ проф. Л.Н.Мкртчяном с сотрудниками и защищенной патентом [5]. ПЭВ содержит пул эмбриональных антигенов (ЭА) и других гликопротеидов, обладает широким спектром биологической активности, включая противоопухолевое действие, способность к индукции интерферона, противовирусный эффект и антимутагенные свойства [6,10]. В последние годы появились исследования, позволяющие считать целесообразным использовать ЭА в качестве компонентов противоопухолевых вакцин [11,12]. В связи с этим, а также учитывая многочисленные литературные данные [1,3,4,9] об иммуносупрессивном действии различных раковых эмбриональных антигенов, представлялось важным исследовать возможный иммуномодулирующий эффект ПЭВ.

В задачу наших исследований входило изучение влияния ПЭВ на уровень и соотношение двух основных регуляторных субпопуляций Т-клеток периферической крови человека — Т-хелперов и Т-супрессоров *in vitro* у здоровых и больных РМЖ.

Материал и методы

Клинико-экспериментальные исследования проводились у 69 здоровых лиц (доноры) в возрасте 19–54 года и параллельно у 72 больных РМЖ в стадии $T_{1-2}N_{0-1}M_0$ в возрасте 36–73 года.

В опытах *in vitro* использовали лиофилизированную ПЭВ, содержащую 10 мг белка во флаконе. Применялись две дозы ПЭВ: I доза – составляла 0,03 мг белка на 1×10^6 моноклеаров, что соответствовало иммунизирующей дозе для человека; II доза ПЭВ, в 10 раз большая – 0,3 мг белка на 1×10^6 клеток, была применена для выяснения возможного неблагоприятного действия высокой дозы ПЭВ на иммунокомпетентные клетки.

Моноклеары из гепаринизированной периферической крови здоровых доноров и больных РМЖ выделяли по методу Воуит [7] в градиенте фиколл-верографин.

Для определения регуляторных субпопуляций Т-клеток использовали методику, разработанную на основе биев – моноклональных АТ (CD4+, CD8+), насаженных на железные шарики (Dynabeads M-450, фирма Dynal A. S. N-0212 Oslo Norway).

Выделенные моноклеары дважды отмывали и разводили в 2 мл среды 199 до концентрации 2×10^6 кл./мл. Бии для определения CD4+ (Т-хелперов) и CD8+ клеток (Т-супрессоров), хранящиеся при +4°C, в день опыта дважды отмывали в среде 199, каждый раз оттягивая их магнитом (не менее 5 мин) к стенке и удаляя среду пипеткой. Отмытые бии, как с CD4+, так и с CD 8+ антигенами в количестве 20–30 мкл помещали в среду с моноклеарами (2×10^6 клеток) и инкубировали при температуре 4°C в течение 45 мин в шейкере. Затем с помощью магнита отделяли каждую субпопуляцию лимфоцитов. После удаления надосадка клетки разводили средой 199 и подсчитывали в камере Горяева.

Результаты и обсуждение

Для исследования возможного токсического действия ПЭВ на моноклеары было изучено влияние двух доз вакцины на уровень жизнеспособных лимфоцитов крови больных (20) и здоровых (19) в суспензионных культурах (2×10^6 клеток в среде 199 с 5% бычьей сывороткой) в течение 5 дней. В опытные пробы моноклеаров вносили соответствующие дозы ПЭВ, растворенные в 0,2 мл среды 199.

Как видно из таблицы, обе дозы ПЭВ вызывали достоверное увеличение количества жизнеспособных лимфоцитов по сравнению с контролем, что указывает не только на отсутствие отрицательного действия ПЭВ на клетки, но и о наличии у вакцины определенной пролиферативной активности.

Влияние ПЭВ на жизнеспособность клеток в суспензионных культурах лимфоцитов

ПЭВ	Количество жизнеспособных лимфоцитов (млн/мл)
Малая доза	1,87±0,12*
Большая доза	1,9±0,07*
Контроль	1,55±0,13

* — достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Результаты определения содержания CD4+ и CD8+ Т-клеток у доноров и влияние ПЭВ на эти показатели представлены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние различных доз ПЭВ на относительный (%) и абсолютный (1мм³) показатели регуляторных субпопуляций Т-клеток у доноров

Доноры	CD4+	CD4+	Т-клетки	Абс.	Абс.	Индекс
	CD8+ клетки на 10 ⁶ монокл.	CD8+ %	на 10 ⁶ монокл.	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+
Контроль (n - 49)	377,9±71,2	38	776	475±31,7	301±38,7	1,58±0,43
	241,1±70,9	24				
Малая доза (n - 18)	376,5±63,7	37	786	470±26,1	316±30,6	1,48±0,35
	253,3±59,5	25				
Большая доза (n - 31)	366,3±66	36,6	808	457±32,5	351±43,4	1,3±0,31
	281,3±73,6	28				

Судя по относительным и абсолютным показателям, малая доза ПЭВ не влияла на уровень CD4+ и CD8+ клеток и лишь незначительно снижала соотношение этих субпопуляций. Большая доза ПЭВ, не влияя существенно на уровень CD4+ клеток, вызывала тенденцию к увеличению CD8+ клеток, что привело к более выраженному снижению соотношения этих субпопуляций (с 1,58 до 1,3).

Результаты действия ПЭВ на содержание изучаемых субпопуляций Т-клеток у больных РМЖ представлены в табл. 3.

Влияние различных доз ПЭВ на относительный (%) и абсолютный (1 мм³) показатели регуляторных субпопуляций Т-клеток у больных

Больные	CD4+	CD4+	Т-клетки	Абс.	Абс.	Индекс
	CD8+ клетки на 10 ⁶ мононукл.	CD8+ %	на 10 ⁶ мононукл.	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+
Контроль (n - 53)	318,3±87,1	32	689	397±28,3	292±28,5	1,37±0,31
	234,1±71,1	23				
Малая доза (n - 15)	298,9±88,8	30	663	373±34,7	290±33,3	1,29±0,33
	232,6±69,9	23				
Большая доза (n - 20)	290,7±76,5	29	697	362±29,6	335±28,5	1,08±0,27
	268,7±75,3	27				

Исходя их данных табл. 3, малая доза ПЭВ также не оказывала статистически достоверных сдвигов относительных и абсолютных показателей изученных субпопуляций у больных. В то же время большая доза ПЭВ, не вызывая достоверных сдвигов в уровне CD4+ клеток у больных, обуславливала более выраженную тенденцию к увеличению уровня CD8+ клеток. Определенные сдвиги в количестве CD8+ клеток привели к снижению индекса соотношений Т-хелперов и Т-супрессоров у больных с 1,37 до 1,08.

Для выявления возможных параллелей между данными *in vitro* и *in vivo* целесообразно сравнить результаты, полученные с малой дозой ПЭВ, с результатами исследований, проведенных сотрудниками ОНЦ у добровольцев — лиц из группы риска, получивших подкожную вакцинацию ПЭВ. Согласно данным литературы [13], спустя 24 часа после иммунизации добровольцев не было отмечено статистически достоверных сдвигов в уровне CD4+ и CD8+ клеток, но у большинства (9 из 15) иммунизированных наблюдалась тенденция к повышению уровня CD8+ клеток, что обусловило снижение индекса CD4+/CD8+ с 1,7±0,45 до 1,5±0,38. На 7-й день после иммунизации содержание изучаемых субпопуляций не отличалось от данных до иммунизации. Итак, корреляция между результатами исследований *in vitro* и *in vivo* очевидна.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что и у здоровых, и у больных ПЭВ в дозе, соответствующей рекомендуемой для иммунизации здоровых лиц, не влияет на уровень Т-хелперов и Т-супрессоров и существенно не меняет их соотношения.

Поступила 15.06.97

**ԲԱԶՄԱՐԺՈՒՅԹ ՍԱՂՄՆԱՅԻՆ ՊԱՏՎԱՍՏԱՆՅՈՒԹԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
T-ԼԻՄՖՈՑԻՏՆԵՐԻ ՌԵԳՈՒԼԱՅՈՒՄ ԵՆԹԱԳՈՊՈՒԼԱՑԻԱՆԵՐԻ ՎՐԱ
ԱՌՈՂՋ ԱՆՉԱՆՑ ԵՎ ԿՐԾՔԱԳԵՂՉԻ ՔԱՂՑԿԵՂՈՎ ՀԻՎԱՆԴՆԵՐԻ ՄՈՏ**

**Զ.Ռ.Տեր-Պողոսյան, Լ.Ն.Սկրտչյան, Զ.Ա.Կարալյան,
Հ.Հ.Դավթյան, Լ.Ա.Բամալյան**

Ի տարբերություն քաղցկեղասաղմնային հակազենների մեծամասնության արտահայտված անընկալաճնշիչ ազդեցության, սաղմնային հակազենների միավորում պարունակող պատվաստանյութը բացասական ազդեցություն չէր քողնում T-լիմֆոցիտների ենթապոպուլացիաների եւ առողջ անձանց ու կրծքագեղձի քաղցկեղով հիվանդների նոս:

Մեր ստացած արդյունքները՝ ԲՄՊ-ի ինտերֆերոնային, հակավիրուսային եւ հականոտազեն ակտիվության մասին ավելի վաղ բացահայտված տվյալների հաշվարկով ցույց է տալիս պատվաստանյութի պրակտիկ օգտագործման նպատակահարմարությունը:

**THE EFFECT OF POLYVALENT EMBRYONIC VACCINE ON REGULATORY
SUBPOPULATION OF T-LYMPHOCYTES IN HEALTHY PERSONS
AND PATIENTS WITH BREAST CANCER**

**Z.R.Ter-Poghosyan, L.N.Mkrtchyan, Z.A.Karalyan,
H.H.Davtyan, L.A.Kamalyan**

Polyvalent embryonic vaccine (PEV) obtained in our center possesses anticancer, interferonogenic and antimutagenic activities. PEV contains the pool of glykoproteids including a number of various oncofetal antigens (OFA). PEV causes an immune response to OFA, which are the most permanent markers of various tumor cells and important factors of tumor immunosuppression. Thus, we studied possible immunomodulating effect of PEV in vitro.

The effect of two doses of PEV on the level of T-cells subpopulations in the blood was studied in vitro by use of monoclonal antibodies. The first one corresponded to the dose which was used for immunization of volunteers, and the second one was ten times more. The first dose of PEV didn't change the level of CD4+ and CD8+ cells. The second dose didn't influence the number of CD4+ cells, but increased the number of CD8+ cells. The data received in vitro show that the dose of PEV used for immunization of healthy persons does not disturb the subpopulations of T-cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абелев Г. И. Мол. генетика, 1994, 3, с. 4.
2. Брондз Б. Д. Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании. М., 1987.
3. Винницкий Б.В., Моисенко Г. В., Глинский Т. М. и др. Биология маркеров рака и беременности. Киев, 1990.
4. Зорин Н. А., Зорина Р. М. Вopr. онкол., 1988, 6, с. 651.

5. *Мкртчян Л. Н., Джагацян Н. Г., Тер-Погосян З. Р., Камалян Л. А.* Патент Российской Федерации, 1996, N 2055589. Способ получения биологически активного вещества, обладающего противоопухолевой иммуномодулирующей и интерфероногенной активностью.
6. *Мкртчян Л. Н., Нерсисян А. К.* Генетика. М., 1993.
7. *Boyum A.* Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968, 21, 97, p. 77.
8. *Chizzm S. E.* Oncofetal transplantation antigeny. Cancer markers. Clifton; New Jersey: HUMANA press., 1980.
9. *Eberlain T.* The immune response to human malignancies: identification of tumor-associated antigens and their clinical utilities. 6th International Congress on Anticancer Treatment, Paris, 1996, p. 23.
10. *Mkrtychyan L.N., Ter-Pogossyan Z.R., Nersissyan A.K., Karalyan Z.A., Kamalyan L.A.* Anticarcinogenic and antitumor effect of polyvalent embryospecific vaccine in experiments. 6th International Congress on Anticancer Treatment, Paris, 1996, p. 102.
11. *Sobol E. R. et al.* Immunogene therapy of cancer. 6th International Congress on Anticancer Treatment, Paris, 1996, p. 64.
12. *Spittler E.* Lynn Engineered vaccines for Cancer. 6th International Congress on Anticancer Treatment, Paris, 1996, p. 118.
13. *Ter-Pogossyan Z.R., Mkrtychyan L.N., Karalyan Z.A., Kamalyan L.A.* Immunomodulation effect of anticancer polyvalent vaccine. 7-th International Congress on Anticancer Treatment, Paris, 1997, p. 236.

