

УДК 616.831—006.327:612.017.1

Особливості порушень у клітинній ланці імунної системи при різних типах нейрофіброматозу

Цимбалюк В.І., Лісяний М.І., Квасніцький М.В.

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України, м.Київ, Україна
Державна медична академія ім. І.Я. Горбачевського, м.Тернопіль, Україна

Ключові слова: нейрофіброматоз, імунологія.

Нейрофіброматоз належить до моногенних спадкових захворювань з високим рівнем поширення в популяції [9]. Залежно від клінічних та генетичних особливостей розрізняють нейрофіброматоз периферичний, або нейрофіброматоз 1-го типу (НФ1), та центральний, або нейрофіброматоз 2-го типу (НФ2). НФ1 — аутосомно-домінантне захворювання, що характеризується наявністю плям кольору кави з молоком, ластовиння в пахвинній та паховій ділянках, шкірних та (або) плексиформних нейрофібром. НФ2 — аутосомно-домінантне захворювання, при якому виникають двобічні невриноми слухових нервів та (часто) інші внутрішньочерепні пухлини. НФ1-ген кодує білок нейрофібромін [12], а ген НФ2 — білок мерлін [14], що є супресорами пухлин [13]. Інактивація нейрофіброміну або мерліну призводить до порушення регулювання росту клітин. У свою чергу, інактивація нейрофіброміну викликається мутацією НФ1-гена, а мерліну — мутацією НФ2-гена. Аналіз мутацій можливий, але надзвичайно трудомісткий і матеріально затратний, типи мутацій дуже різноманітні, до їхнього розпізнавання слід підходити індивідуально [8]. Тому нейрофіброматоз залишається клінічним діагнозом, постановка якого потребує використання певних специфічних діагностичних критеріїв. Отже, незважаючи на вражаючі досягнення генетики, діагноз нейрофіброматозу та його лікування й досі ґрунтуються на клінічних ознаках.

Метою нашого дослідження було виявити характерні зміни в імунореактивності хворих на нейрофіброматоз як додаткові ознаки для уточнення і об'єктивізації оцінки організму на пухлинний процес залежно від його поширення [1]. Враховуючи той факт, що при нейрофіброматозі можуть уражатися різні ділянки периферичних нервів та мозку, як головного, так і спинного, а також можливість рецидивування цього захворювання, доцільним є дос-

лідження імунного статусу і особливо ланки імунітету, пов'язаної з протипухлинним захистом та імунним наглядом за виникненням пухлин в організмі [1,6,7]. Досягти цього можна при визначенні показників клітинного імунітету, субпопуляційного складу лімфоцитів, особливо Т-клітин: кілерів і супресорів та природних кілерів. Літературні дані про зміни імунного статусу при нейрофіброматозі дуже обмежені і мають фрагментарний характер [10,11].

Матеріали та методи дослідження. Нами досліджено клітинний імунітет у 41 хворого на нейрофіброматоз, з яких НФ1 виявлено в 32 осіб і НФ2 — у 9. У пацієнтів з НФ1, середній вік яких становив 23,6 року, були множинні нейрофіброми шкіри та периферичних нервів. У 5 діагностовано гліоми зорових нервів, у 4 — невриноми спінальних нервів, у 2 — менінгіоми, у 1 — плексиформну нейрофіброму та у 1 — заочеревинну нейрофіброму. У хворих на НФ2, середній вік яких дорівнював 25,2 року, зареєстровано 17 неврином слухових нервів, 2 невриноми іншої локалізації, 5 менінгіом та 1 гліому зорового нерва. Контрольну групу склали 12 практично здорових студентів. Субпопуляції лімфоцитів визначали за допомогою моноклональних антитіл згідно з рекомендаціями фірми «Сорбен» (Росія) з незначними змінами [2]. Спонтанну цитотоксичність мононуклеарів досліджували за спектрофотометричним методом в 18-годинному тесті з використанням клітин-мішеней еритроцитів курей [5]. Антитілозалежну цитотоксичність мононуклеарів вивчали за спектрофотометричним методом у модифікації О.Ф.-Мельникова і Т.А. Заяц [5]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили згідно зі стандартним пакетом програм для персонального комп'ютера з визначенням $M \pm m$ і величини статистичної вірогідності. Критерієм оцінки суттєвої різниці аналізованих показників

був коефіцієнт вірогідності (критерій Стюдента).

Обговорення одержаних результатів.

Аналіз імунологічних даних, одержаних у досліджуваних групах, показує, що в хворих на нейрофіброматоз спостерігаються певні відхилення в показниках клітинного імунітету. У хворих і в донорів зберігається приблизно однаковий відсотковий вміст у крові основних субпопуляцій лімфоцитів (табл. 1). У пацієнтів на нейрофіброматоз помітно збільшений рівень, порівняно зі здоровими людьми, В-лімфоцитів у крові ($13,27 \pm 1,36\%$ при нормі $7,8 \pm 1,04\%$). Привертає увагу достатньо високий вміст Т-лімфоцитів і Т-лімфоцитів-хелперів (такий, як у здорових осіб), тоді як при інших пухлинах нервової системи і позамозкових пухлинах встановлено зниження рівня Т-хелперів у крові [3].

Певним чином характеризує стан протипухлинного імунітету вміст у крові хворих на нейрофіброматоз рівня СД-8-лімфоцитів і NK-клітин, які відображають неспецифічні цитотоксичні функції, в тому числі і реакції імунного нагляду в організмі.

Проведеними дослідженнями встановлено наявність дисоціації у складі цитотоксичних лімфоцитів, а саме: у хворих на нейрофіброматоз виявлено вірогідне підвищення вмісту СД-8-лімфоцитів на фоні помірного вірогідного зменшення кількості NK-клітин у крові, що свідчить про розвиток нейрофіброматозу в умовах зниженого імунного нагляду з боку NK-клітин. Таким чином, судячи субпопуляційного складу лімфоцитів, у хворих на нейрофіброматоз має місце незначний дисбаланс у вмісті Т- і В-лімфоцитів, тобто збільшений рівень В-лімфоцитів на 15—30% від норми, а, з іншого боку, серед основних субпопуляцій зафіксовано зростання рівня СД-8-субпопуляцій лімфоцитів, порівняно зі здоровими особами. Вірогідне зменшення вмісту NK-клітин в крові у хворих на нейрофіброматоз, як уже зазна-

чалося вище, може свідчити про порушення в генерації природних кілерних клітин і про можливе зниження їх функції. Причини і механізми вибіркового пригнічення генерації природних кілерних клітин, ймовірно, пов'язані з новоутвореннями, які хоч і належать до категорії доброякісних, все ж формуються внаслідок пухлинного процесу нервової системи, для якого характерне пригнічення природних кілерів [2,4,5].

Зміни вмісту природних кілерних клітин у крові хворих на нейрофіброматоз можуть призводити до порушення цитотоксичної активності Т-лімфоцитів. Проведеними дослідженнями встановлено, що у таких хворих на вірогідно знижується спонтанна цитотоксична активність мононуклеарів крові до $22,70 \pm 1,80\%$ при нормі $30,0 \pm 3,90\%$ ($p < 0,05$). Порівняно зі спонтанною цитотоксичною активністю виявлено більше пригнічення антитілозалежної цитотоксичності, в якій беруть участь специфічні антитіла і клітини, що несуть Fc-рецептор на своїй поверхні. Такими клітинами, як відомо, є моноцити, значна частина Т-лімфоцитів і NK-клітини. Також встановлено, що у хворих на нейрофіброматоз достатньо інтенсивно підвищене майже в 2 рази гальмування цитотоксичної антитілозалежної активності, порівняно із здоровими людьми. Так, рівень антитілозалежної цитотоксичної активності мононуклеарів крові у хворих на нейрофіброматоз становив $25,67 \pm 2,14\%$, тоді як у здорових осіб він складав $46,05 \pm 2,20\%$.

Отже, у хворих на нейрофіброматоз встановлено вірогідне зниження рівня NK-клітин і деяких видів цитотоксичної активності, особливо антитілозалежної, що свідчить не тільки про пригнічення природного нагляду за пухлинним процесом, але і про гальмування специфічної цитотоксичної активності, що здійснюється за допомогою специфічних антитіл і відповідного рецептора до мононукле-

Таблиця 1. Особливості порушень клітинного імунітету при різних типах нейрофіброматозу

Обстежувана група	Кількість обстежених	Рівень у крові						
		лейкоцитів	лімфоцитів	СД3-лімфоцитів (Т-лімфоцитів)	СД4-лімфоцитів (Т-хелперів)	СД8-лімфоцитів (Т-супресорів)	В-клітин	СД16-лімфоцитів (NK-клітин)
Усі хворі на нейрофіброматоз	41	$4,69 \pm 0,13$	$36,93 \pm 1,58$	$63,49 \pm 2,17$	$32,46 \pm 1,74$	$27,37^* \pm 1,90$	$13,27^* \pm 1,36$	$15,78^* \pm 0,94$
Хворі на НФ1	32	$4,59 \pm 0,14$	$35,73 \pm 1,72$	$63,97 \pm 2,38$	$33,38 \pm 2,12$	$28,89^* \pm 2,18$	$13,46^* \pm 1,40$	$16,02 \pm 1,02$
Хворі на НФ2	9	$5,20 \pm 0,34$	$42,20 \pm 3,29$	$61,26 \pm 5,80$	$34,4 \pm 2,53$	$20,66 \pm 1,80$	$18,44^* \pm 6,23$	$14,66^* \pm 2,50$
Донори	12	$7,76 \pm 0,82$	$31,80 \pm 3,90$	$65,80 \pm 7,20$	$33,23 \pm 3,90$	$21,50 \pm 2,00$	$7,80 \pm 1,04$	$18,90 \pm 2,30$

Примітка. * — Вірогідні зміни порівняно з контрольними даними ($p < 0,05$)

Таблиця 2. Цитотоксична активність мононуклеарів крові у хворих на нейрофіброматоз

Показники цитотоксичності	Донори	Хворі на		
		нейрофіброматоз	НФ-1	НФ-2
Кількість хворих	12	41	32	9
Спонтанна цитотоксична активність, %	30,00±3,90	22,70±1,80	23,50±2,04	19,10±3,91
P		<0,05	<0,05	<0,05
Антигілозалежна цитотоксична активність, %	46,05±2,20	25,67±2,14	27,41±2,46	22,40±4,20
P		<0,05	<0,05	<0,05

арів крові та прямою цитотоксичною дією (табл.2).

Отримані дані характеризують також особливості імунних порушень залежно від типу нейрофіброматозу. У хворих на НФ2, в порівнянні з хворими на НФ1, виявлено більші відхилення в субпопуляційному складі лімфоцитів (табл.1). Якщо вміст Т-лімфоцитів і Т-лімфоцитів-хелперів у крові хворих цих двох груп був однаковий, то всі інші досліджувані показники різнилися між собою. Так, рівень СД-8-лімфоцитів (лімфоцитів-супресорів, цитотоксичних лімфоцитів) був у пацієнтів з НФ1 близький до значень, які мали місце у всіх хворих на нейрофіброматоз, і становив $28,89 \pm 2,18\%$, тоді як у групі з НФ2 вміст цих клітин дорівнював $20,66 \pm 1,80\%$ ($p < 0,05$). Що стосується вмісту В-лімфоцитів, то необхідно вказати на високу їх концентрацію у крові хворих на НФ2, яка значно перевищує концентрацію В-лімфоцитів у донорів і хворих на НФ1 ($18,44 \pm 6,23\%$ порівняно з $13,46 \pm 1,40\%$). Хоча виявлені відмінності статистично невірогідні, з огляду на велику варіацію показників, спостерігається чітка тенденція до дисбалансу у вмісті Т- і В-лімфоцитів у бік збільшення В-лімфоцитів. У той же час рівень субпопуляції СД-16-клітин (природних кілерів) у хворих на НФ2 був дещо нижчий, ніж у хворих на НФ. При НФ2 виявлено суттєвіший дисбаланс лімфоцитів, зниження концентрації як НК-клітин і СД-8-цитотоксичних клітин, що свідчить про більше пригнічення природного і специфічного протипухлинного імунітету. У зв'язку з цим певний інтерес становить вивчення стану цитотоксичної активності лімфоцитів у хворих на нейрофіброматоз обох типів. Проведеними дослідженнями встановлено, що у хворих на НФ2 спостерігається хоч і невірогідне, але суттєвіше пригнічення цитотоксичної спонтанної активності, а також і антигілозалежної цитотоксичності мононуклеарів. У групі хворих на НФ2 ці показники становили $19,10 \pm 3,91\%$ і $22,40 \pm 4,20\%$, тоді як у пацієнтів з НФ1 вони дорівнювали $23,50 \pm 2,04\%$ і $27,41 \pm 2,46\%$. Таким чином, відбувається зниження не тільки вмісту клітин у

крові, пов'язаних з протипухлинним наглядом і імунітетом, але і їх функціональної активності, особливо антигілозалежної цитотоксичності у хворих на НФ2. Можна вказати на певні імунні відмінності у хворих на НФ1 і НФ2. Для НФ1 характерне вірогідне підвищення рівня СД-8-лімфоцитів, а при НФ2 такого підвищення вмісту СД-8-лімфоцитів не виявлено.

Отже, підсумовуючи результати визначення субпопуляційного складу лімфоцитів у хворих на нейрофіброматоз, слід зазначити, що в цих пацієнтів підвищений рівень В-лімфоцитів у крові і в той же час значно пригнічена неспецифічна протипухлинна реактивність, а саме: знижені показники вмісту НК-клітин і спонтанної та антигілозалежної цитотоксичності. Отримані відомості про зміну протипухлинної активності при нейрофіброматозі узгоджуються з багаточисленними даними літератури, які свідчать про зниження цієї функції в організмі хворих при наявності пухлини. У випадку нейрофіброматозу одержані дані мають особливе значення, оскільки для цієї категорії хворих характерні багаточисленність пухлинних вогнищ і можливість рецидивування. Вважається, що такі характерні особливості пухлин генетично детерміновані, в той же час отримані нами результати дослідження вказують на те, що ці порушення розвиваються на фоні селективних розладів імунного нагляду, які проявляються зниженням рівня НК-клітин і пригніченням цитотоксичної активності, а також активацією В-клітинної ланки імунітету. Виявлено також, що при центральній формі нейрофіброматозу імунні порушення більше виражені. Це дозволяє зробити припущення, яке потребує проведення подальших досліджень, що селективна імуносупресія при нейрофіброматозі є однією з умов поширення і різноорганного прояву даного виду пухлин [10]. Сподіваємось, що активація цієї ланки імунітету зможе запобігати подальшому поширенню в організмі цих пухлин, що в комбінації з призначенням препаратів, спрямованим на корекцію генотипу при даних пухлинах, це дозволить ефективно лікувати і особливо попереджувати рецидиви пухлин.

Висновки. 1. При нейрофіброматозі спосте-

рігається дисбаланс у вмісті основних субпопуляцій лімфоцитів крові: відмічено збільшення рівня Т-супресорів та В-лімфоцитів і зменшення рівня НК-клітин при збереженому рівні Т-хелперів.

2. Нейрофіброматоз супроводиться значним пригнічення природної кілерної і антитілозалежної цитотоксичності мононуклеарів крові.

3. Імунні зміни в організмі хворих залежать від типу нейрофіброматозу. При НФ2 вони більше виражені: виявлено значне зниження концентрації НК-клітин і пригнічення цитотоксичної активності лімфоцитів крові.

Список літератури

1. *Бережная Н.М., Чехун В.Ф.* Система интерлейкинов и рак — 2000. — 224 с.
2. *Зозуля Ю.П., Лисяний М.І.* Нейрогенний імунodefіцит при вогнищевих ураженнях головного мозку та його клінічне значення // Журн.АМН України. — 1998. — №1. — С.44—63.
3. *Лисяний Н.И., Маркова О.В., Главацкий А.А.* Количественные и функциональные характеристики НК-клеток, выделенных из опухолей, как показатель для иммунотерапии глиом головного мозга // В кн.: Иммунотерапия при лечении злокачественных опухолей. — К., 1998. — С.75—77.
4. *Лисяний Н.И., Маркова О.В., Ромоданов С.А.* Чувствительность клеток человека различной степени анаплазии к лизису опосредованному естественными киллерами // Бюллетень эксперб. биол. мед. — 1991. — №8. — С.190—191.
5. *Мельников О.Ф., Зяму Т.А.* Сравнение радиоизотопного и спектрофотометрического методов определения цитотоксичности клеток // Лаб. диагностика. — 1999. — №1. — С.43—45.
6. *Новиков Д.К.* Противоопухолевые реакции лейкоцитов. — 1988. — 266 с.
7. *Чечнев С.Б.* Фенотипическая и функциональная гетерогенность циркулирующего пула естественных киллеров // Иммунология. — 1999. — №4. — С.24—27.
8. *Ars E. et al.* Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type1 // Hum. Mol. Genet.- 2000. — V.9, N.2. — P.237—244.
9. *Crawford A.H., Schorry E.K.* Neurofibromatosis in children: the role of the orthopaedist // J. Amn. Acad. Orthop. Surg. — 1999. — V.7, N.4. — P.217—230.
10. *Gerosa P.L., Vai C., Bizzozero L. et. al.* Local immune response in neurofibromatosis type1 and type2 // Minerva Med. — 1993. — V.84, N.1—2. — P.23—31.
11. *Kilic S., Tezcan I., Sanal O., Ersoy F.* Conunon variable immunodeficiency in a patient with neurofibromatosis // Pediatr Int. — 2001. — V.43, N.6. — P.691—693.
12. *Park K.C. et al.* Identification of two novel frame shift mutations of the NF1 gene in Korean patients with neurofibromatosis type 1 // J. Korean Med. Soc. — 2000. — V.15, N.5. — P.542—544.
13. *Roukav G.A. et al.* Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type2 // Nature. — 1993. — V.363. — P.515—521.
14. *Trofatter J. A. et al.* A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumors suppressor // Cell — 1993. — V.72. — P.791—800.

Особенности нарушений в клеточном звене иммунной системы при различных типах нейрофиброматоза

Цымбалюк В.И., Лисяний Н.И., Квасницький Н.В.

Исследован клеточный иммунитет у 41 больного нейрофиброматозом, из которых нейрофиброматоз 1-го типа диагностирован у 32 человек, а нейрофиброматоз 2-го типа — у 9 человек. У наблюдаемых выявлены угнетение естественной киллерной и антителозависимой цитотоксичности мононуклеаров крови, дисбаланс в содержании основных субпопуляций лимфоцитов: увеличение уровня Т-супресоров и В-лимфоцитов, снижение уровня НК-клеток при сохраненном уровне Т-хелперов. Определена зависимость этих изменений от типа нейрофиброматоза.

Features of violations in a cell-like link of the immune system at different types neurofibromatosis

Tsybaliuk V.I., Lisyany N.I., Kvasnitsky M.V.

The cellular immunity in 41 patients with neurofibromatosis is investigated. Among them neurofibromatosis 1 — 32 patients, neurofibromatosis 2 — 9 patients. Suppression of the natural killer's activity and antibody-dependent cytotoxicity of mononuclears, disbalance in main subpopulations of lymphocytes — augmentation of T-suppressors level and B-lymphocytes, decreasing of NK-cells level and normal level of T-helpers — are revealed. Kependence of changes on type of neurofibromatosis is also determined.