

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ

«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКИХ
ПРОБЛЕМ СЕВЕРА»

СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ
НАУК

На правах рукописи

Агилова Юлия Николаевна

Роль молекулярных и клеточных механизмов в прогрессировании
множественной миеломы

14.03.03 - патологическая физиология,

биологические науки

Диссертация на соискание ученой степени

Кандидата биологических наук

Научные руководители:

член-корреспондент РАН,

Профессор,

доктор медицинских наук,

В.Т. Манчук;

доктор медицинских наук,

О.В. Смирнова

Красноярск - 2014

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3-4
ВВЕДЕНИЕ	5-10
Глава 1. Обзор литературы.	
1.1. Множественная миелома – клинические патологические особенности	11-28
1.2. Роль клеточного звена иммунитета при онкологических заболеваниях	29-32
1.3. Роль гуморального звена иммунитета при онкологических заболеваниях	32-35
1.4. Роль цитокинов в возникновении и прогрессировании онкологических заболеваний	36-40
1.5. Роль нейтрофильных гранулоцитов в возникновении и прогрессировании онкологических заболеваний	40-42
Глава 2. Материал и методы исследования	
2.1 Материал исследования	42-44
2.1.1. Общая характеристика обследованных пациентов	44-47
2.2.2. Иммунологические методы исследования	48-49
2.2.3. Хемилюминесцентный анализ нейтрофильных гранулоцитов	50-50
2.2.4. Статистические методы исследования	50-51
Глава 3. Особенности молекулярных и клеточных механизмов при прогрессировании множественной миеломы	
3.1. Особенности клеточного звена иммунитета у больных множественной миеломой в зависимости от стадии заболевания	52-63
3.2. Особенности гуморального звена иммунитета у больных множественной миеломой в зависимости от стадии заболевания	63-69
3.3. Особенности содержания цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО-альфа, интерферон-гамма при множественной миеломе в зависимости от стадии заболевания	69-83
3.4. Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных множественной миеломой в зависимости от стадии заболевания	83-91
Глава 4. Обсуждение полученных результатов	92-109
ВЫВОДЫ	110-111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	112-137

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ИЛ-1 - интерлейкин 1
- ИЛ-6 - интерлейкин 6
- КТ - компьютерная томография
- ЛДГ - лактатдегидрогеназа
- ММ – множественная миелома
- МГНЗ (MGUS) - моноклональная гаммапатия неопределенного значения
- МРТ - магнитнорезонансная томография
- МО – минимальный ответ
- НГ - нейтрофильные гранулоциты
- ХЛ- хемилюминесценция
- PI - международный прогностический индекс (International prognostic index)
- ПЭТ – позитронно-эмиссионной томография
- ПР - полная ремиссия
- nПР – близкая к полной ремиссия (nCR – near Complete remission)
- ПО – полный ответ
- NADPH - форма никотинамиддинуклеотидфосфата
- TNF – опухоленекротический фактор
- ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
- ТПСК - трансплантацией периферических стволовых клеток
- Tmax – время выхода на максимум хемилюминесценции
- FISH– флюоресцентная insitu гибридизация
- VJ - Бенс-Джонса белок
- Ig – иммуноглобулин
- Imax - интенсивность хемилюминесценции
- ISS - International Staging System
- Pig- патологический иммуноглобулин
- SIgA - секреторный белок

Синд - площадь индуцированной кривой хемилюминесценции

Спонт - площадь спонтанной кривой хемилюминесценции

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Множественная миелома (ММ) - заболевание системы крови, обусловленное злокачественной пролиферацией плазматических клеток, с последующей инфильтрацией ими костного мозга, наличием моноклонального иммуноглобулина (М-протеина), остеолитическими поражениями костей и развитием почечной недостаточности [80, 175, 133].

По данным классификации REAL (1994г.) – болезнь относится к периферическим В-клеточным лимфоидным опухолям низкой степени злокачественности. В среднем частота заболеваемости составляет 3 на 100000 населения в год, при этом отчетливо прослеживается связь с возрастом. У больных старше 60 лет заболеваемость регистрируется у 37 на 100000 населения [68]. Каждый год в России регистрируется около 20000 новых случаев заболевания ММ. Средний возраст больных составляет 62 года [35, 98]. В последнее время увеличилось число больных моложе 40 лет, так по данным Воробьева А.И. (2003г) до 5% от всех случаев заболеваний приходится в этой возрастной группе [37]. В целом за последние годы отмечается увеличение общего числа случаев заболеваний ММ.

Согласно классификации выделяют 5 иммунохимических вариантов ММ в зависимости от продуцируемого иммуноглобулина: G, A, D, E, а также несекретирующая миелома, при которой иммуноглобулины не выделяются. Частота распределения нормальных иммунохимических типов ММ соответствует концентрации нормальных иммуноглобулинов в сыворотке крови: G-миелома обнаруживается в 50% случаев, A-миелома — в 25%, D-миелома — в 1%, M-миелома и несекретирующая форма встречаются очень редко [28, 31, 99]. Наиболее прогностически благоприятным вариантом считается ММ G-иммунохимического варианта.

На сегодняшний день современные способы терапии (химиотерапия, лучевая) безусловно, способствуют увеличению продолжительности и повышению качества жизни больных ММ, все-таки успехи в лечении этого

заболевания отстают от уровня, достигнутого в отношении других злокачественных опухолей кроветворной системы [108]. Общая продолжительность жизни больного от момента постановки диагноза до гибели не превышает 8 лет, при этом медиана выживаемости составляет 4,5 года [25, 98]. На первом месте среди причин смертности стоят инфекционные осложнения [77, 90,137, 141]. Существуют местные и генерализованные инфекционно-воспалительные процессы. Наиболее часто при ММ встречаются сепсис, пневмонии, тяжелые поражения желудочно-кишечного тракта [24, 58]. Инфекционно-воспалительные процессы способствуют прогрессированию онкологического заболевания, значительно утяжеляя состояния больного. Даже адекватная антибактериальная терапия не всегда способствует купированию этих осложнений. Таким образом, инфекционные осложнения являются неблагоприятным прогностическим фактором в прогрессировании ММ.

Несмотря на ряд проведенных исследований, многое в патогенезе ММ не изучено. До конца не определены взаимосвязи между злокачественной опухолью и особенностями реагирования иммунной системы. Отсутствуют исследования, в которых изучались комплексно особенности врожденного, адаптивного иммунитета, не проводилось одномоментное исследование неспецифического [60, 127], регуляторного, клеточного, гуморального звеньев иммунной системы в зависимости от стадий заболевания и наличия осложнений [136, 124].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить молекулярные и клеточные механизмы прогрессирования множественной миеломы и разработать метод прогнозирования развития инфекционных осложнений у больных множественной миеломой.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изучить особенности взаимосвязей показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета у больных множественной миеломой в зависимости от стадии заболевания и поражения почек.

2. Дать характеристику спонтанной и индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных множественной миеломой в зависимости от стадии заболевания и поражения почек.

3. Оценить роль и значимость изменения концентраций ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма-интерферона в зависимости от стадии заболевания у больных множественной миеломой.

4. Разработать инновационные патогенетически обоснованные способы прогнозирования инфекционных осложнений у больных множественной миеломой.

НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

Впервые, на современном методическом уровне показана важная роль иммунной системы в развитии и прогрессировании множественной миеломы в зависимости от стадии заболевания. У больных множественной миеломой вне зависимости от стадии заболевания выявляется угнетение клеточного и гуморального звеньев иммунитета. У больных множественной миеломой развивается комбинированный, вторичный Т, В – клеточный иммунодефицит. Нарастают признаки недостаточности В-лимфоцитарного звена. Уровень НК-клеток снижается на всех стадиях заболевания. На II стадии заболевания характерен дисбаланс в клеточном звене иммунитета и однонаправленная активация нейтрофильных гранулоцитов. На III стадии – увеличение спонтанной при снижении индуцированной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов. При поражении почек функциональные свойства нейтрофильных гранулоцитов значительно снижаются.

Приоритетными являются сведения о том, что одним из механизмов способствующих развитию инфекционных осложнений является цитокинопосредованная иммуносупрессия, с преобладанием провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма интерферон) над противовоспалительными (ИЛ-4) и девиацией клеточного иммунного ответа по Th-1-типу.

На основании выявленных механизмов развития инфекционных осложнений предложен способ прогнозирования развития инфекционных осложнений у больных множественной миеломой (заявка на патент №2014124794 от 17.06.2014).

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Результаты исследования и выводы являются способом для оптимизации диагностики и лечения больных ММ и выступают в качестве дополнительных критериев.

Полученные в результате исследования данные углубляют фундаментальное представление о патогенезе ММ.

ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, внедрены в рабочий процесс Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательского института медицинских Проблем Севера» СО РАН (г. Красноярск) в лабораторию клинической патофизиологии и аллергологии, для обучения клинических ординаторов, в лекциях для врачей лечебных учреждений, а так а также использованы при обучении студентов, магистров Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского Федерального Университета (г. Красноярск).

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Важную роль в прогрессировании множественной миеломы играют молекулярные и клеточные изменения в клеточном, гуморальном и неспецифическом звеньях иммунитета. Молекулярные и клеточные нарушения характеризуются дисбалансом, проявляющимся во всех звеньях иммунитета. Угнетение клеточного, гуморального иммунитета и изменение хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов зависят от стадии заболевания и поражения почек.

2. Одним из ведущих механизмов, способствующих возникновению инфекционных осложнений при ММ является цитокинопосредованная иммуносупрессия, обусловленная нарушением соотношения концентраций про- и противовоспалительных цитокинов.

3. Разработан и обоснован новый способ диагностики инфекционных осложнений у больных ММ, основанный на оценке соотношений про- (ИЛ-2, ФНО-альфа) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4).

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД

Автором сформулирована рабочая гипотеза, осуществлялся отбор больных и практически здоровых лиц для исследования, проведены иммунологические исследования, выполнена статистическая обработка данных, их интерпретация, подготовка публикаций, диссертации и заявки на изобретение.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Основные результаты диссертации представлены на заседаниях лаборатории патологической физиологии и аллергологии ФГБУ «НИИ медицинских Проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск (2012, 2013, 2014г.), на межлабораторном заседании ФГБУ «НИИ медицинских Проблем Севера» (Красноярск, 2014г.). Основные положения изложены на X научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы охраны

здоровья населения регионов Сибири» (Красноярск, 2012 г.). На XI научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири» (Красноярск, 2013 г.). На Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы долголетия» (Красноярск, 2014 г.). На XII научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири» (г. Красноярск, 2014 г.). На итоговой конференции «Вопросы сохранения и развития здоровья населения севера и Сибири» (г. Красноярск, 2014 г.).

ПУБЛИКАЦИИ

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук. Подготовлена заявка на изобретение «Прогнозирование течения инфекционных осложнений при ММ на разных стадиях заболевания» (№2014124794 от 17.06.2014).

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ

Материал диссертации изложен на 137 страницах машинописного текста, иллюстрирован 15 рисунками, 19 таблицами. Работа состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературы. Список литературы состоит из 219 источников, в том числе 132 отечественных и 87 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Множественная миелома – клинико-патофизиологические особенности

Множественная миелома (ММ) (Миеломная болезнь, генерализованная плазмацитома, болезнь Рустицкого-Кайлера) – самый частый злокачественный В-лимфопрролиферативный гемобластоз [115]. По классификации REAL, миелома относится к лимфоидным опухолям низкой степени злокачественности [49].

Среди всех злокачественных новообразований в разных этнических группах людей ММ составляет 1%, а в структуре гемобластозов до 20% [2, 98, 137, 127, 49]. Ежегодно в Европейских странах регистрируются четыре новых случая на 100 000 населения [5, 161, 198]. В России согласно статистическим данным за 2006г. было зарегистрировано 2,3 тыс. больных ММ, из которых умерло от заболевания 1,7 тыс. [34, 72]. По данным РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, заболеваемость ММ в России в 2000 г. составляла 1,24 на 100000 населения, а в Москве 1,9 на 100000 населения [26]. По данным Федерального регистра Владимирской области по онкогематологии за 2012 год (по сравнению с 2011 годом) уровень заболеваемости по ММ увеличился на 12 %. За 2012 год на 28 % увеличился процент госпитализаций в гематологическое отделение пациентов с ММ. На первом месте в структуре смертности среди гематологических заболеваний выступают острые лейкозы, на долю ММ приходится 11%. Частота заболеваемости ММ в последние десятилетия, наряду с неходжкинскими лимфомами и острыми миелобластными лейкомиями, заметно возрастает [107, 215]. По данным Национального Института Онкологии, ежегодно выявляются около 20000 новых случаев заболевания множественной миеломой, которая является вторым по распространённости видом онкологических заболеваний кроветворной системы после неходжкинской

лимфомы. Высоки случаи смертности как от самой ММ, так и от сопутствующих заболеваний (инфекционных и вирусных). Для того, чтобы повысить выживаемость больных ММ требуется не только эффективная патогенетическая терапия, но и профилактика возникновения инфекционных осложнений на любой стадии заболевания.

Множественная миелома до настоящего времени остается неизлечимым заболеванием [68], вследствие развития у больных резистентности ко всем видам известной терапии [60].

Множественная миелома известна как болезнь пожилого возраста. По данным Воробьева А.И., риск развития ММ увеличивается с возрастом, при этом средний возраст начала заболевания приходится на 69 лет [98, 161, 68, 49]. Частота заболевания увеличивается с возрастом.

По данным других авторов, ММ чаще встречается в возрасте старше 40 лет, одинаково часто как у мужчин, так и у женщин [13, 97]. У больных старше 60 лет заболеваемость регистрируется у 37 на 100000 населения [68]. Средний возраст больных составляет 62 года [25, 98]. В последнее время увеличилось число больных моложе 40 лет, так по данным Воробьева А.И. 2003г. до 5% от всех случаев заболеваний приходится в этой возрастной группе. В целом за последние годы отмечается увеличение общего числа случаев заболеваний ММ. Наблюдается омоложение болезни, все чаще ММ возникает у лиц моложе 55 лет, что может указывать на важность влияния окружающей среды в качестве этиологического фактора. Более частое развитие ММ у близких родственников и однояйцовых близнецов свидетельствует о значимости генетических факторов и наследственной предрасположенности [15].

Термин «множественная миелома» был предложен в 1873 г. Джоном Рустикким (J. Rustizky). Связь этого заболевания с патологией плазматических клеток впервые обнаружил Райт в 1900 г [2]. Г.А. Алексеевым первый описал и дал название «Миеломная болезнь» в СССР в 1949г. [49] а первое описание клинического случая ММ в 1845 принадлежит

William Macintyre, названной как «мягкие и хрупкие кости» («mollities and fragilitas ossium») [95, 102].

Основным субстратом опухоли являются плазматические клетки, предшественницы отдельной трансформированной клетки [115, 13, 185]. Молекулярный патогенез ММ носит многоступенчатый характер. В-лимфоциты могут трансформироваться в опухолевые в результате транслокации или нарушения экспрессии онкогенов в локусе тяжелых цепей IgH (тяжелых цепей иммуноглобулинов) на 14 хромосоме в регионе q32. Кроме того, в патогенезе опухолевой трансформации принимает участие, по крайней мере, один из пяти генов-партнеров: BCL1/PRAD-1/cyclin D1 (11q23), cyclin D3 (6p21), FGFR3-MMSET (4p16.3), c-maf (16q23), mafB (20q11). На фазе сформировавшегося заболевания выявляются вторичные транслокации гена Ig и вторичные мутации генов (c-myc, p53 и др.) [15, 66]. Считается, что аномалии в развитии полипептидной стволовой клетки, претерпевшие хромосомные нарушения, такие как моносомия или делеция хромосомы 13 или трисомия хромосом 3, 5, 7, 9, 11, 15 и 19 способствует появлению в дальнейшем ММ [207]. При этом развивается дополнительная хромосомная нестабильность, что приводит к мутациям экспрессии таких ключевых генов как C-myc, N-ras, K-ras, FGFR3 и p53 [45, 186].

Хотя множественная миелома – клональное заболевание, хромосомные нарушения при использовании стандартных методов цитогенетического исследования выявляются только у 20-60% больных на ранних этапах заболевания и у 50-90% больных с III стадией заболевания. Наибольшую информативность имеет метод флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с флюоресцентным окрашиванием цитоплазматических иммуноглобулинов (cIg FISH или FICTION), который выявляет аномалии в 89% случаев. Специфические изменения кариотипа включают количественные и структурные нарушения кариотипа. Наиболее часто у больных ММ выявляется моносомия 13 хромосомы (или потеря части 13 хромосомы), более редко – моносомия X, Y, 14, 8 хромосом и трисомия или тетрасомия 9

хромосомы, более редко – 3, 19, 15, 11, 7, 5, 18, 21 хромосом. Структурные изменения хромосомного аппарата у больных ММ схожи с изменениями при других лимфопролиферативных заболеваниях. Изменения в области региона 14q (switch-регион Н-цепи Ig) связаны с транслокациями t(11;14)(q13;q32), t(8;14)(q24;q32), t(14;18)(q32;q21); изменения в области региона 16p или 16q – с транслокациями t(1;16)(p11;p11), t(1;16)(p10;p10). Кроме того, возможны структурные изменения в области 1p или 1q (частичная делеция, трисомия), 19q13 или 19p13, 6q, 17q, 17p, 2p12, 22q11, 7q. Цитогенетическое исследование при ММ имеет принципиальное значение, так как позволяет сформировать группу риска и выбрать оптимальный подход к лечению. Кроме того, цитогенетическое исследование и FISH используются для диагностики и лечения резидуальной болезни у больных ММ [149].

В патогенезе ММ принимают участие сотни различных генов, определяющих процессы пролиферации, дифференцировки, клеточного апоптоза, секрецию цитокинов и факторов роста. В настоящее время с помощью молекулярно-генетических методов (метод секвенирования и метод микроаррея гибридизации) выявлена экспрессия 9732 генов и составлен каталог экспрессированных генов при ММ (Myeloma Gene Index) [152].

Несмотря на то, что плазматические клетки присутствуют во всех органах и тканях, после мутации такие клетки способны прорасти в костную ткань, почки, формируя картину распространенной многоочаговой опухоли, что отражает название болезни [97]. Если плазматические клетки пролиферируют локально, то опухоль относят к плазмацитоме.

В основе патогенеза лежит взаимодействие костного мозга с неопластическими клетками. Вследствие нарушения которого может возникнуть опухолевая адгезия, нарушение баланса между остеобластами и остеокластами, что приводит к стимуляции продукции про- и противовоспалительных цитокинов и опухолевому росту [35, 61, 107, 133].

Причины, способствующие развитию ММ, на сегодняшний день так и остаются неизвестными. До настоящего времени предложено множество

теорий о превращении нормальных клеток в раковые [80]. К потенциальным рискам, способствующим возникновению и прогрессированию, относят и контакт с канцерогенами, радиоактивными веществами, а также ухудшение общего состояния окружающей экологической обстановки и неврологические расстройства у людей [174, 211].

Так же в качестве одной из причин развития ММ рассматривают транслокацию гена 14q32 под воздействием инфекций или хронических воспалений. В результате дополнительных мутаций гена происходит изменение клеток, развитие онкологического заболевания и прогрессирование воспаления [151].

В патогенезе ММ биохимический маркер ИЛ-6 играет особую роль, так как способствует росту гепатоцитов и стимулирует остеокластную активность, подавляя остеобласты. А так же ингибирует провоспалительные цитокины, и способствует стимуляции и пролиферации миеломных клеток и их предшественниц [73].

Клиническая картина при ММ складывается из ряда синдромов: костного, почечного, анемического и геморрагического [58, 71, 91, 100, 106]. При ММ часто имеют место резорбция плоских костей. В основе патогенеза литических поражений кости лежит ингибция остеобластов, и активация остеокластов [217]. Под влиянием остеокласт-стимулирующего фактора развиваются остеопорозы и остеодеструкции.

При ММ увеличивается экспрессия рецептора лиганда ядерного фактора $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) (RANKL) и снижается антагонист рецептор - остеопрогерина, что приводит к увеличению клеточного апоптоза. В основе увеличения экспрессии RANKL лежит повышенная продукция миеломными клетками макрофагального воспалительного белка MIP1 α [218]. В генезе остеолитического лежит также повышенная продукция DKK1, паратиреоидного протеина, остеокласт активирующего фактора [69, 84]. Увеличение отношения RANKL к остеопрогерину отражает снижение активности остеобластов и увеличение активности остеокластов [57].

По данным Ederson M.J. и соавторов (2014г.), при ММ в 45% случаев происходит поражение позвоночника в виде компрессий спинного мозга с корешковыми болями и нарушением функций тазовых органов [190, 195].

Боли в костях – это самый распространенный признак при ММ. Со временем развивается триада Калера – болевой синдром в костях, остеодеструкции и спонтанные переломы. При движении или изменении положения тела пациента болевой синдром обычно усиливается. Больные ММ поступают в гематологические отделения и узнают о своем диагнозе в основном после обследования и лечения у травматолога [75, 205].

ИЛ-6 способствует росту гепатоцитов и стимулирует остеокластную активность, подавляя остеобласты. Помимо изменений в продукции рецепторов, поражения в костях объясняются влиянием парапротеинов, и повышенной секрецией миеломных клеток цитокинов таких, как ИЛ-6, который. ИЛ-6, ингибирует провоспалительные цитокины, а IFN γ и IL-4 вместе подавляет выработку цитокинов, соответствующих (Th1 и Th2) групп. При прогрессировании ММ ИЛ-6 является наиболее значимым, так как способствует стимуляции и пролиферации миеломных клеток и их предшественниц [73]. Высокая концентрация ИЛ-6 отмечается при агрессивном течении и прогрессировании ММ [166,209].

В результате чего, кости приобретают пористую структуру и становятся чрезвычайно хрупкими. Очаговые изменения имеют, полиоссальный характер, возникая преимущественно в плоских костях свода черепа, ребрах, грудины, позвонках и тазовых костях. Переломы ребер и грудины могут приводить к значительной деформации грудной клетки. Поражения характеризуются множественными округлыми или овальными «пробойниковыми» дырами в костях с четкими контурами. Под влиянием небольшого физического воздействия и неловкого движения в больших трубчатых костях (чаще в бедренной и плечевой) нередко наблюдаются патологические переломы.

Повышенная резорбция костной ткани приводит к развитию у 20-40%

больных ММ гиперкальциемии, которая способствует ухудшению концентрационной способности канальцев, ухудшению гломерулярной фильтрации, вызывает повреждение почек и развитие полиурии. Гистологически поражение канальцев вследствие гиперкальциемии проявляется некрозом и приводит к развитию почечной недостаточности.

Преципитация солей кальция и накопление нефротоксического моноклонального Ig может приводить к повреждению функции почек, наблюдаемая у части больных [154, 168]. Известны случаи, когда стойкая протеинурия была единственным симптомом ММ на протяжении многих лет течения болезни. Миеломная нефропатия является важнейшим неблагоприятным прогностическим фактором и одинаково уменьшает выживаемость пациентов при различных стадиях заболевания [119]. Почечная недостаточность – одна из основных причин смерти больных ММ. Поражение почек проявляется в виде парапротеинемического нефроза, протекающего с выраженной протеинурией, наличием гиалиновых, реже зернистых и эпителиальных цилиндров. Часто в моче обнаруживается белок Бенс-Джонса (BJ), выпадающий в осадок при нагревании мочи до 50—60 °С и растворяющийся при дальнейшем кипячении. При ММ свойственно быстрое развитие недостаточности почек [199].

Изменения крови связаны с токсическим поражением костного мозга миеломными клетками. Устойчивые анемии развиваются при вытеснении эритробластических элементов миеломными клетками. У 60-70% больных ММ при первичном обращении к врачу выявляется анемия, как правило, нормоцитарная, нормохромная [27, 93]. Однако в половине случаев сочетается с умеренной лейкопенией и тромбоцитопенией. При эффективной химиотерапии, уменьшении опухолевой массы анемический синдром, как правило, исчезает [98].

Увеличение в сыворотке крови моноклонового патологического белка может приводить к нарушению свертывания крови и развитию геморрагического синдрома. Гипоальбуминемия отмечается у большинства

больных ММ и обусловлена с одной стороны - нарушением белок синтетической функции печени, с другой – повышенной потерей белка с мочой [98].

Повышенная секреция патологического моноклонального белка приводит к гиперпротеинемии. Этот синдром обусловлен гиперпродукцией плазматическими клетками парапротеинов – патологических иммуноглобулинов или белка VJ. Содержание в крови общего белка возрастает до 90–100 г/л и выше. Гиперпротеинемия обусловлена гиперглобулинемией, количество альбуминов в сыворотке крови снижается. [98].

Гиперпротеинемия приводит к синдрому гипервязкости крови. Повышение вязкости плазмы, вызванная высоким уровнем циркуляции миеломных белков, продуцируемых плазматическими клетками, может вызывать геморрагический синдром с образованием синяков [53]. Кроме того, больные ММ страдают разнообразными неврологическими симптомами. Количество лейкоцитов и тромбоцитов в начале в пределах нормы, в дальнейшем развивается лейко- и тромбоцитопения. Ранним и характерным симптомом заболевания является увеличение СОЭ (60— 80 мм/ч), что объясняется глубоким нарушением белкового обмена [98].

Инфекции у больных ММ могут быть вызваны как бактериальными агентами, так и вирусами. Больные ММ часто страдают герпес-вирусными инфекциями, в том числе Herpes zoster [135, 98].

В связи со снижением продукции нормальных антител и повышением концентрации моноклонового патологического белка происходят изменения в гуморальном иммунитете и повышается риск инфекционных осложнений. Клиническим признаком ММ является частые бактериальные и вирусные инфекции, грамположительных и грамотрицательных. Такие как пневмококковая, герпес-вирусные инфекции, в том числе и Herpes zoster [129]. Во многих случаях инфекции затрагивают верхние дыхательные пути, проявляясь осложнениями в виде пневмоний, бронхитов и синуситов.

Значительно реже инфекционный процесс затрагивает кожу, урогенитальный и гастроинтестинальный тракты. По данным О.А. Рукавицина и Г.И. Сидоровича (2006 г.), на момент диагностики ММ чаще всего отмечается поражение органов дыхания и инфекции мочеполовых путей, обычно они вызываются *S. Pneumoniae* и *H. Influenzae*, в дальнейшем в посевах начинают преобладать стафилококки и грамотрицательная флора. При лечении больных ММ высокодозной химиотерапией и антибиотиками развиваются грибковые инфекции. В различные периоды ММ риск развития бактериальных инфекций не одинаков: в начальной фазе заболевания он в 4 раза выше, чем в ремиссии; а в первые два месяца химиотерапии в 2 раза выше, чем в остальное время. Больные ММ, подвержены повторным респираторным инфекциям, особенно пневмониям. Кроме этого, восприимчивость больных ММ к инфекциям обусловлена активизацией эндогенной инфекции, особенно такие осложнения наблюдаются при проведении высокодозной химиотерапии или после трансплантации костного мозга, когда организм ослаблен за счет опухолевого заболевания [22, 120]. На первом месте среди причин смертности у больных ММ стоят инфекционные осложнения [77, 90, 137, 141]. Инфекционно-воспалительные процессы способствуют прогрессированию онкологического заболевания, значительно утяжеляя состояния больного. Даже адекватная антибактериальная терапия не всегда способствует купированию этих осложнений. Таким образом, инфекционные осложнения являются неблагоприятным прогностическим фактором в прогрессировании ММ. Опухоль сама может способствовать развитию инфекционных осложнений [36,49, 104, 203, 213]. Доказано, что между опухолью и иммунной системой существуют взаимодействия, приводящие не только к угнетению опухоли, но и к защите от патологии и даже к стимуляции роста опухоли.

Вследствие опухолевой интоксикации у больных ММ, могут наблюдаться общая слабость, недомогание, похудание. У менее 20% больных отмечается повышение температуры, не связанное с инфекцией, до

субфебрильных цифр и активное потоотделение. У малой части больных обнаруживают гепато- и спленомегалию [4]. При том опухолевые плазмоклеточные инфильтраты могут обнаруживаться практически во всех внутренних органах и в коже, что связано со специфической миеломноклеточной пролиферацией, миеломно-миелоидной или чисто миелоидной трехосновой пролиферацей. Так же поражаются и лимфатические узлы.

Чем ниже пролиферативная активность плазматических клеток, тем больше продолжительность фазы «плато» и длительность жизни больного. Важно подчеркнуть, что по ходу заболевания могут наблюдаться множественные периоды ремиссий и рецидивов (Рис.1) [70]. При прогрессировании ММ, которое неизбежно происходит при использовании стандартной химиотерапии, возникают новые опухолевые клоны, и заболевание переходит в терминальную фазу [152]. Современная терапия значительно продлевает жизнь больных ММ. Так без лечения средняя продолжительности жизни больных составляет 7-13 месяцев, с лечением достигает 50 месяцев [97].

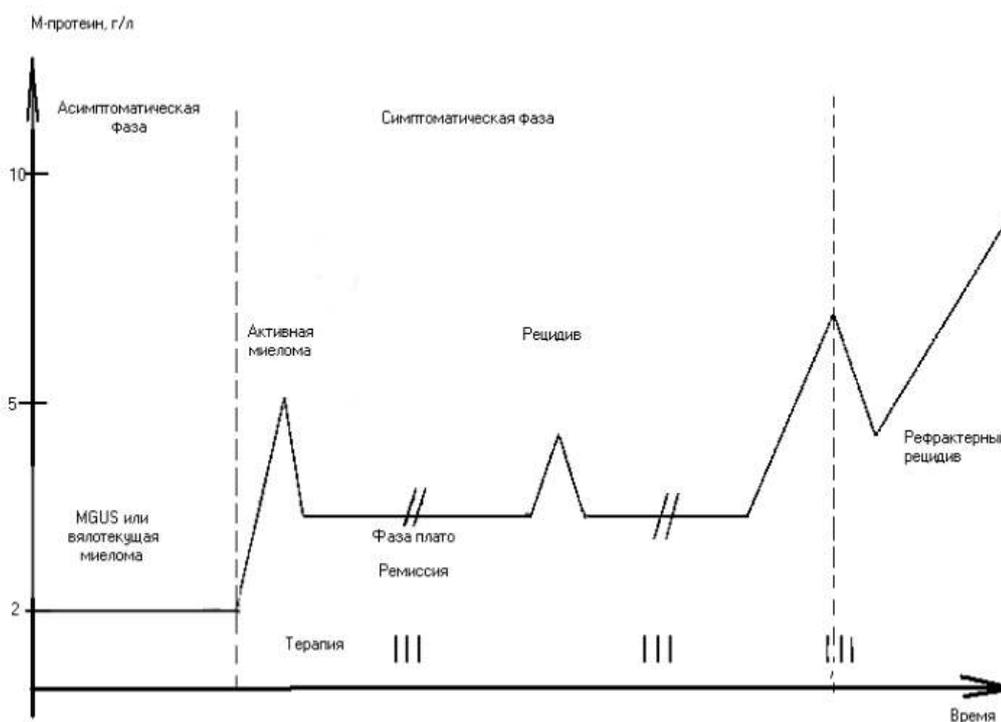


Рис. 1 Фазы развития заболевания. (О.М. Вотякова, Е.А. Демина, 2007)

Классификация ММ является рабочим инструментом врача-гематолога и позволяет принимать решение о тактике лечения. Как уже указывалось, множественная миелома относится к группе злокачественных моноклональных гаммапатий [172].

На данный момент существуют несколько рабочих классификаций за рубежом и в России. Классификация лимфоидных опухолей REAL (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms - Пересмотренная Европейско-американская классификация) объединяет все нозологические единицы. В России широко применяется классификация ВОЗ лимфоидных опухолей (1997 г.), по которой ММ - это заболевание относящиеся к группе В-клеточных опухолей с фенотипом зрелых (периферических) клеток и охарактеризовано как миелома, или плазмочитома (солитарная и внекостная). Так же в настоящее время в клинической практике часто руководствуются классификацией острых лейкозов FAB (ФАБ), разработанной в 1976 г. группой гематологов Франции, США, Великобритании – и в последующем модифицированная [163, 191]. Она основана на цитологической характеристике доминирующей популяции бластов с учетом цитохимических реакций и ультраструктуры лейкозных клеток рядом авторов (В. Демешек, цитируется по А.Ш. Зайчику и А.П. Чурилову, 2002 г.) разработана классификация по количеству лейкоцитов в периферической крови. Гемобластозы на той или иной стадии их течения квалифицируют как:

- лейкемические (резкое увеличение количества лейкоцитов – $100,0 \cdot 10^9/\text{л}$ и выше);
- сублейкемические (увеличение числа лейкоцитов до $100,0 \cdot 10^9/\text{л}$);
- алейкемические (число лейкоцитов не изменено);
- лейкопенические (число лейкоцитов уменьшено – $< 4 \cdot 10^9/\text{л}$).

Парапротеин миеломного инфильтрата может поражать не только костный мозг, но и другие органы и ткани вызывая солитарную опухоль. Исходя из клинико-анатомической классификации по характеру распространенности инфильтрата выделяют из всех случаев

генерализованных плазмоцитом следующие формы: диффузно-очаговую (60%), диффузную (24%), множественно-очаговую (15%), и редкие формы (1%) [161].

В зависимости от вида продуцируемого патологического иммуноглобулина ММ протекает в виде нескольких иммунохимических вариантов [52]. Моноклональный белок (М-парапротеин) состоит из тяжелой цепи Ig или их комбинаций в различных сочетаниях с легкими цепями Ig: κ (каппа) и λ (лямбда), соединенные дисульфидными связями с тяжелыми цепями, а тяжелые цепи ковалентно соединены между собой в области шарнира. Соответственно иммунохимический вариант ММ определяют по свойственной секреции в крови тех или иных типов парапротеинов (М-компонента): М-, А-, Е-, G-миеломы [161, 160]. Клиническая картина заболевания зависит от того какой вид парапротеина вырабатывается. Например, IgA – ассоциируется с внескелетными зонами поражения, IgD - с плазмочеточной лейкемией и повреждением почек, IgG - обладает классическими признаками миеломы [30]. Наиболее прогностически благоприятным иммунохимическим вариантом является IgG -вариант ММ [97]. Смертность при IgE и IgD – вариантах ММ намного меньше чем при других вариантах [192].

При определении типа М-протеина используют иммунофиксацию, при которой возможно идентифицировать как тяжелые, так и легкие цепи [29]. Типы продуцируемого моноклонального протеина различаются у каждого конкретного пациента. Наиболее часто встречаются G-миелома, на долю которой приходится 75% случаев, при А-миеломе - 21%, D-миеломе – 1%. Продукция моноклонального парапротеина может быть одного типа, либо двух так называемая биклональная, так же с секрецией только моноклональной легкой цепи (κ или лямбда) - миелома ВJ и несекретирующая миелома [98]. Основным диагностическим признаком опухоли является опухолевый белок, который выявляется посредством иммуноэлектрофореза в крови и моче [125, 215]. Данный метод позволяет

разделить белки на фракции в геле с использованием моноклональных антител к иммуноглобулинам, вырабатываемым опухолевыми клетками, и определяет, к какому типу ММ принадлежит данное заболевание, что имеет важное значение в определении прогноза и выборе оптимального лечения [25].

Причины возникновения биклональной миеломы окончательно не установлены. Считается, что в основе биклональной ММ лежит возникновение мутаций в области генов, ответственных за синтез иммуноглобулинов на разных этапах созревания В-лимфоцита, а также возникновение второго клона патологических плазматических клеток в рамках опухолевой прогрессии заболевания [134].

В последнее время определение олигосекретирующей биклональной ММ стало возможно методом ПЦР, которую ранее классифицировали как не секретирующую миелому [179].

В редких случаях у больных обнаруживается «несекретирующая» миелома, при которой клетки продуцируют малое количество или вообще не производят моноклонального белка какого-либо типа. Раньше было трудно данный тип диагностировать, однако с помощью недавно разработанного метода - тест FREELITE (анализ свободных легких цепей в сыворотке) удастся выявить наличие мельчайшего содержания легких цепей в крови у пациентов [62]. Патогенетические особенности заболевания будут зависеть от количества М-компонента. Однако бывают случаи, когда могут обнаруживаются в небольшом количестве легкие цепи иммуноглобулинов. При системных аутоиммунных заболеваниях, при туберкулезе и вторичном амилоидозе [19]. Однако при этой патологии в моче присутствуют одновременно легкие цепи обоих типов κ и λ , в то время как при ММ – выявляются только моноклональные легкие цепи κ или λ , а в других случаях κ или λ .

Прогноз при ММ у каждого конкретного больного определяется как количеством, так и специфическими свойствами миеломных клеток, такие

как скорость роста, уровень продукции моноклональных протеинов, наличия или отсутствия различных цитокинов и химических агентов, которые повреждают клетки, ткани, органы и вызывают их функциональную неполноценность [81, 122, 167, 188].

В 1975 г. Дьюри /Сальмон (Durie/Salmon) была разработана система стадирования ММ. Эта система сопоставляет главные клинические критерии с массой миеломных клеток. В соответствии с критериями Дьюри — Салмона, ММ подразделяют на три стадии в зависимости от содержания М - белка и клеточной опухолевой массы у больных.

На I стадии обнаруживаются критерии:

- гемоглобин более 100 г/л;
- кальций сыворотки в пределах нормы или менее 2,6 ммоль/л (10,5 мг/дл);
- нормальная костная структура (по шкале - 0) при рентгенологическом исследовании или солитарная костномозговая плазмацитома;
- низкий уровень продукции М-компонента (уровень IgG менее 50 г/л, уровень

IgA менее 30 г/л, в моче при электрофорезе М-компонент легких цепей менее 4 г /24 часа).

На II стадии наблюдаются средние значения между II и III стадией:

- гемоглобин более 85 г/л, но менее 100 г/л;
- кальций в сыворотке 2,6 -3,0 ммоль/л;
- костные повреждения по шкале 0-3;
- средний уровень продукции М-компонента:

(уровень IgG более 50-70 г/л, уровень IgA 30-50 г/л, в моче при электрофорезе, М-компонент легких цепей >4г., но <12г/24ч.).

На III стадии один или более критериев из нижеперечисленных:

- гемоглобин менее 85 г/л;
- кальций в сыворотке более 3,0 ммоль/л (12 мг/дл);
- распространенные литические костные повреждения (по шкале - 3);

- высокий уровень продукции М-компонента:

(уровень IgG более 70 г/л, уровень IgA более 50 г/л, в моче при электрофорезе

М-компонент легких цепей более 12 г /24 ч.

Кроме этого выделяют стадии А и В в зависимости от нарушения функции почек.

Выделяют I А, II А, III А стадии, при которых содержание креатинина в сыворотке крови < 177 ммоль/л., и I В, II В, III В, где содержание креатинина в сыворотке крови > 177 ммоль/л. Осложнения со стороны почек являются серьезными нарушениями и могут быть одной из причин смерти пациентов [7, 8, 5]. По данным авторов из 102 обследованных больных ММ - 32 человека или 31% больных имеют признаки почечной недостаточности [104].

В соответствии с международной классификацией (International Staging System (ISS) (2005г.) [170] ММ так же подразделяют на III стадии в зависимости от количестве полипептида - β 2 микроглобулина.

Для обозначения прогрессирования опухоли при ММ выделяют развернутую (хроническую) и терминальную (острую) стадию [97].

В настоящее время в связи с внедрением в клиническую практику новых рентгенорадиологических методов исследования предложена новая система стадирования ММ по данным позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с 18-фтордезоксиглюкозой и магнитно-резонансной томографии (МРТ) (Durie/Salmon PLUS система стадирования).

Так же за рубежом используется система стадирования ММ по величине β 2-микроглобулина и альбумина в сыворотке крови, предложенная югозападной онкологической группой в 2003 году (SWOG система).

К прогностически неблагоприятным факторам при ММ относят повышение уровня β 2-микроглобулина, альбумина сыворотки, увеличение уровня креатинина, С -реактивного белка, снижение уровня гемоглобина и количества тромбоцитов в крови, наличие плазмобластов в миелограмме, наличие гиподиплоидии и делеции или моносомии 13 хромосомы, высокий

пролиферативный индекс плазматических клеток, возраст больных старше 65 лет, общее состояние больного (Performance status) по шкале ECOG-B03 3 или 4[183].

Больные ММ требуют активной химиотерапии на II и III стадии заболевания, на I стадии осуществляется выжидательная тактика. Состояние у пожилых – доброкачественная гаммапатия, которая так же характеризуется повышением М-протеина и имеет пограничное состояние. На I стадии заболевания доброкачественную моноклональную гаммапатию трудно отличить от плазмоцитомы или ММ [197].

Учитывая разнообразность клинических проявлений, течения заболевания, в настоящее время разработаны диагностические критерии ММ (симптоматической миеломы), индолентной (тлеющей) миеломы, солитарной плазмоцитомы, МГНЗ. Эти критерии основываются на лабораторно-инструментальных данных [14,123].

Международная группа по изучению ММ, возглавляемая Durie и Kyle (2003 г.), для постановки диагноза ММ считает достаточным наличие 3 критериев заболевания (Рекомендован Научным Советом Международной Группы по изучению множественной миеломы (Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation), опубликованными в The Hematology Journal, 2003, 4, 379-398) [205]

Диагностические критерии ММ:

Большие критерии

- наличие плазмоцитов в пунктате тканей;
- плазмоциты в костном мозге < 30%;
- моноклональный белок в сыворотке крови: > 35,0 г/л; IgG>20,0 г/л; IgA 1,0 г/24 ч; κ или λ легких цепей в моче (протеинурия Бенс-Джонса).

Малые критерии:

- плазмоциты в костном мозге 10-30%;
- моноклональный белок в меньшем количестве, чем при больших критериях;

- очаги остеолитического в костях;
- содержание нормальных иммуноглобулинов: IgM < 0,5 г/л; IgA < 1,0 г/л; IgG < 6,0 г/л.

Диагноз подтверждается при наличии 1 большого критерия и одного малого критерия или 3 критерия малых, но обязательно 1-й+2-й.

После установления диагноза ММ назначают лечение. Успех терапии в значительной степени зависит от своевременной диагностики и контроля его эффективности лечения [67, 104]. До настоящего времени ММ остается заболеванием, трудно поддающимся лечению [49]. Комплексной химиотерапии подвергаются больные на II или на III стадиях заболевания.

Основные виды лечения больных ММ: схемы цитостатических препаратов, трансплантация костного мозга, аферез гемопоэтических стволовых клеток, высокодозная химиотерапия с сочетанием с лучевой [97, 23, 96]. Полные и устойчивые ремиссии при использовании химиотерапии получить не удаётся [114, 138, 165, 201].

Кроме этого всегда назначается сопроводительная терапия, применение антибактериальной терапии для лечения частых инфекционных осложнений [193].

В настоящее время не существует единой концепции лечения ММ. Лечение оценивают через 3 месяца после назначения терапии. Оно считается эффективным, если у больных стабилизируются показатели крови, гемоглобин более 90 г/л, альбумин более 30 г/л, и уровень кальция снижается ниже 3 ммоль/л, а остеодеструктивные очаги не увеличиваются в количестве и размерах. При установлении стабильных показателей используют понятие «фаза плато». При переходе больного в «фазу плато», врачами-гематологами назначается дальнейшая тактика лечения. [49, 157].

Если лечение эффективно, и значительная часть опухолевых клеток погибла, все равно остается вероятность активации сохранившихся «резидуальных» клеток и, как следствие, рецидив заболевания. Поэтому этим

пациенты находятся под постоянным врачебным наблюдением на поддерживающей терапии.

Критерии эффективности цитостатической терапии при ММ разработаны Национальным раковым институтом США (1968, 1973г.). Объективное улучшение регистрируется при одном из следующих показателей, сохраняющимся более 2 месяцев:

- снижение концентрации Рlg в сыворотке более чем на 50% (ниже 40 г/л);
- снижение экскреции белка ВJ более чем на 50% (не выше 0,5 г/сут.) по отношению к исходному уровню;
- регрессия площади опухолей, определяемой произведением двух наибольших диаметров, на 50%;
- появление рентгенологических признаков скелетных поражений [98].

Длительность жизни больного в большей степени зависит от чувствительности опухоли к терапии. Лечение улучшает клиническую ситуацию приблизительно у 75% пациентов.

На сегодняшний день современные способы терапии (химиотерапия, лучевая) безусловно способствуют увеличению продолжительности и повышению качества жизни больных ММ, все-таки успехи в лечении этого заболевания отстают от уровня, достигнутого в отношении других злокачественных опухолей кроветворной системы. Многие в патогенезе ММ не изучено. До конца не определены взаимосвязи между злокачественной опухолью и особенностями реагирования иммунной системы. Отсутствуют исследования, в которых изучались вместе особенности врожденного адаптивного иммунитета, не проводилось комплексное исследование неспецифического [60, 127, 158], регуляторного, клеточного, гуморального звеньев иммунной системы в зависимости от стадий заболевания и наличия осложнений [46, 136, 116].

1.2. Роль клеточного звена иммунитета при онкологических заболеваниях

Клеточное звено иммунитета один из важнейших компонентов противоопухолевой защиты организма, включающее системы распознавания, запоминания, презентации и элиминации опухолевых антигенов. Известно, что решающую роль в канцерогенезе, детерминации длительности каждой из стадий ММ и скорости пролиферации трансформированных клеток отвечают изменения в микроокружении поврежденной клетки [88, 209].

Иммунная система осуществляет различные защитные функции организма, такие как противомикробная, противоопухолевая защиты. Иммунная система включает компоненты клеточного (макрофаги, дендритные клетки, НК - натуральные киллеры, Т- и В-лимфоциты) и гуморального (антитела), цитокины и обеспечивают генетическую целостность организма на протяжении его индивидуальной жизни [41, 115, 189]. Выделяют 2 субпопуляции НК-клеток, различающиеся соотношением мембранных маркеров и функциями - $CD56^+$ высокий уровень экспрессии маркера $CD16$ – и $CD56^+$ низкий уровень экспрессии маркера $CD16^+$ клетки. Наиболее важные функции НК-клеток - это цитотоксическая активность в отношении опухолевых клеток организма, их цитолиз и секреция цитокинов. Источниками естественных киллерных клеток могут быть натуральные киллерные клетки, а также $CD4^+$ и $CD8^+$ - лимфоциты. Противоопухолевая защита организма осуществляется Т- лимфоцитами и естественными НК-клетками. НК-клетки после активации ИЛ2 или ИЛ1, ИФН- γ приобретают способность разрушать опухолевые клетки [20]. Кроме того, отмечено, что НК - клетки после активации способны усиливать экспрессии дифференцировочных антигенов $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$ и $CD22^+$. Другие авторы отмечают, что у больных со злокачественными опухолями, особенно при продолжительном опухолевом росте, отмечается не только количественное снижение субпопуляций $CD3^+$, $CD4^+$, $CD16^+$, $CD8^+$ лимфоцитов, но и

снижается их способность распознавать и связываться с опухолевыми клетками [8, 12, 113]. При этом не выявлено какой-либо корреляции между степенью анаплазии опухоли и параметрами иммунологического статуса [7,10, 13, 16, 44, 51, 54, 89, 115, 56].

В периферической крови человека НК-клетки составляют 10-12% от общего числа лимфоцитов. Около 80% НК-клеток имеют CD8⁺ - рецептор, секретируют различные цитокины ИФН-у, ФНО-р ГМ-КСФ, ИЛ-10 и мигрируют в лимфатические узлы. Основная роль этих клеток в иммунной системе сводится к обнаружению и уничтожению опухолевых и инфицированных вирусами клеток [173,214].

Так CD3⁺-лимфоциты (Т-клетки) в крови взрослого здорового человека содержат CD3⁺-клеток 1,1-1,7*10⁹ клеток/л (58-76%). Их повышение свидетельствует о гиперактивации иммунитета [211].

CD4⁺ участвуют в антигенпрезентации клеток, представлена тимоцитами (80-90%) Т-лимфоцитами (80-90% из них), макрофагами, клетками Лангерганса, дендритными клетками, гранулоцитами. Существуют различные виды Th-клеток, их роль специфична, хотя все они представлены CD4⁺ - лимфоцитами. Th1 – в активированном состоянии синтезируют ряд цитокинов: ИЛ-2, гамма-интерферон. Обуславливают противоопухолевую резистентность, регулируют синтез IgG и IgA иммуноглобулинов. Th2 – при активации синтезируют интерлейкины 4, 5, 9, 10 и 13. Участвуют в регуляции синтеза IgE. Th17 – продуцируют значительное провоспалительных цитокинов, что определяет их роль в защите против инфекций. Th0 - предшественник лимфоцитов Th1 и Th2 типов. Синтезируют ряд цитокинов, характерных для обеих субпопуляций Т-хелперов (ИЛ-2, гамма-интерферон, ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13). Увеличение количества Т-лимфоцитов-хелперов свидетельствует о стимуляции иммунной системы, а снижение — об иммунологической недостаточности [146, 182, 200, 208].

CD8⁺-цитотоксическиклетки на 25-35% представлены Т-лимфоцитами и тимоцитами (70-80%). Клетки-супрессоры, тормозящие иммунный ответ

организма и выработку антител вследствие задержки пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов. Относительное увеличение количества CD8⁺ - клеток может быть обусловлено уменьшением количества Т-хелперов. И свидетельствует о клеточной недостаточности иммунитета [196, 208, 211].

Активированные Т-лимфоциты экспрессируют на своей мембране CD95 рецептор. После адгезии иммунного лимфоцита к опухолевой клетке вступает во взаимодействие CD95 рецепторно-лигандная система, Т-клетка получает сигнал апоптоза и погибает, не успев выполнить свою киллерную функцию. В норме такой тип защиты от клеток иммунной системы существует в иммунологически привилегированных органах.

У онкологических больных по данным авторов [3, 8, 21, 32, 39, 42, 48, 77, 86, 112, 113, 155, 196, 211], снижена реактивность клеточного звена иммунной системы, при этом неадекватность и неэффективность опухолевоспецифического иммунного ответа развивается на фоне субкомпенсированного состояния иммунитета, преимущественно за счет Т-клеточного иммунодефицита, который являясь вторичным, и возникает в результате угнетения иммунной системы, с одной стороны, иммуносупрессивного влияния самой опухоли с другой стороны [132]. Так по данным Смирновой О.В. и других авторов (2008 г.), недостаточная активность противоопухолевого иммунитета связана с нарушением регуляторных механизмов в иммунной системе (нарушение соотношения популяционного состава лимфоцитов в крови) и данный иммунологический дисбаланс проявляется как в виде дополнительных взаимодействий между различными субпопуляциями лимфоцитов, так и в ослаблении взаимодействий между ними (Олейник Е.К. с соавт., 2001). При этом установлена четкая закономерность усиления экспрессии дифференцировочных антигенов CD4, CD8, CD16 и CD22 у онкологических больных, активационные маркеры (CD25, HLA-DR, CD71) обнаруживаются на значительно большем числе лимфоцитов крови опухолевых больных, по сравнению с контролем [11]. Также, предполагается, что при опухолевом

росте активируются супрессорные клетки (Ярилин А.А., 1999). Природа их неизвестна. Предполагается, что в качестве супрессорных клеток могут выступать макрофаги и Т-лимфоциты. В качестве гипотезы предполагается супрессорная роль Th2-клеток, которые выступают в качестве антагонистов Th1-клеток, определяющих цитотоксический противоопухолевый ответ. Кроме того, частично роль Th2-клеток берут на себя опухолевые клетки, вырабатывая цитокины, являющиеся продуктами Th2-клеток: интерлейкины 10 и 6 (Hidalgo G.E. et al., 2002; Contasta I. et al., 2003).

Таким образом, в настоящее время идет активное изучение аспектов взаимодействия иммунной системы с развитием и прогрессированием онкологического заболевания [50, 59].

1.3. Роль гуморального звена иммунитета при онкологических заболеваниях

Антитела были открыты в 1890 г. Э. Берингом (E. Behring) и С. Китасато (S. Kitasato). Иммуноглобулины (Ig) важнейшие факторы специфического гуморального иммунитета. В сыворотке здорового человека около 35% составляют Ig. Сборка Ig происходит из отдельных сегментов, и при построении имеет разнообразные формы и варианты полипептидной цепи. Это обеспечивает при попадании в организм любого антигенного эпитопа связывание с комплементарным паратипом в составе антигенсвязывающего фрагмента (Fab - фрагмента) какого-либо иммуноглобулина. Для связывания с антигенными эпитопами между первым и вторым доменами константного фрагмента тяжелых цепей располагается шарнирная область, благодаря которой обеспечивается возможность пространственной ориентации Fab-фрагментов. С тяжелыми цепями Ig связаны отдельные олигосахариды, от степени гликозилированности которых зависят их биологические свойства [131].

У человека в зависимости от строения и аминокислотного состава тяжёлых цепей различают пять классов иммуноглобулинов— IgG, IgA, IgM, IgD, IgE [143,148, 175]. Частота классов и типов патологических иммуноглобулинов (Pig) при ММ в целом коррелирует с соотношением классов и типов нормальных иммуноглобулинов у здоровых людей [31].

В- лимфоциты трансформируют плазматические клетки, которые синтезируют Ig [145, 164, 171]. Роль иммуноглобулинов различных классов в иммунной защите организма различна. Поскольку первыми экспрессируются μ -цепи, в ходе иммунного ответа ранее других начинает секретироваться IgM. IgM-антитела обладают высокой способностью связывать комплемент, агглютинировать и лизировать клетки-мишени. В то же время обладая относительно низким сродством к антигену, и отсутствием на эффекторных клетках иммунной системы рецепторов для Fc-части молекулы IgM. Роль IgM-антител в экстренной защите организма на ранних этапах иммунного ответа достаточно велика, так как они первыми вырабатываются в ответ на острую инфекцию [144].

Через 5 суток после внедрения инфекции начинается синтез антител класса IgG [178]. Это антитела, на долю которых приходится основная часть антител на поздних этапах первичного и при вторичном иммунном ответе, обладают рядом преимуществ перед IgM-антителами. Их роль состоит преимущественно в прямой нейтрализации патогенов. IgG присутствуют на поверхности В-лимфоцитов и активируют комплемент по классическому пути - «антиген-антитело». Благодаря токсиннейтрализующей, вируснейтрализующей, опсонизирующей и бактерицидной активности обеспечивают основополагающую роль при защите от инфекционных заболеваниях. Концентрация IgG возрастает в ответ на хроническую или внезапную инфекцию, а также при ММ [73, 144].

IgA — основной иммуноглобулин секретов слизистых оболочек и главный фактор специфической защиты. Включает два вида специфических белков: сывороточный и секреторный (SIgA). Главная функция IgA защита

слизистых оболочек дыхательных, мочеполовых путей и желудочно-кишечного тракта от инфекций и подавление хронических местных воспалительных процессов. IgA инактивирует бактерии и вирусы, активирует комплемент по альтернативному пути. Снижение уровня свидетельствует о недостаточности гуморального и местного звеньев иммунитета. Могут быть сигналом о наличии новообразований, присутствия острой вирусной, хронической бактериальной инфекции. Уровень продукции IgA значительно выше, чем других классов иммуноглобулинов, так как у него короткий полупериод жизни и значительная часть его секретируется в виде SIgA. Содержание в сыворотке в норме у взрослых колеблется 0,9-4,5 г/л [73].

Содержание IgD и IgE в сыворотке крови очень низко. IgD экспрессируется в составе BCR; роль IgD в сыворотке крови не установлена. Однако IgD находится на поверхности В-лимфоцитов, выполняя функции иммуноглобулиновых антиген-распознающих рецепторов. На долю заболеваемости MM D вариантом приходится 2% от всех случаев [192].

Несмотря на то, что IgE является минорным компонентом сывороточных иммуноглобулинов, он обладает значительной активностью в защите от паразитов. IgE играет ключевую роль при аллергии немедленного типа, обуславливает развитие многих аллергических реакций, обладает способностью к быстрой фиксации с поверхностными структурами базофилов и тучных клеток. При повторном контакте с антигеном приводит к развитию клинических проявлений анафилаксии [118]. Повышение концентрации до 15 000 Кг/л и выше свидетельствует о наличии IgE-варианта MM.

Прогноз для больных с несекретирующей миеломой, то из последних наблюдений следует, что при несекретирующей миеломе прогноз на улучшение состояния более оптимистичный, чем у пациентов с секреторной миеломой [62, 177,181].

В настоящее время доказано, что уровень иммунореактивности определяется морфологическим составом клеток иммунной системы и

концентрацией иммуноглобулинов в сыворотке крови (Борисова М.А. с соавт., 1997) [103, 131, 150].

Роль гуморального иммунитета при онкологических заболеваниях неоднозначная. Существует концепция «блокирующих антител», согласно которой, иммунная система находится в антагонистических взаимоотношениях с опухолью. Содержащиеся в сыворотке крови блокирующие факторы представляют собой опухолевые антигены, циркулирующие в крови в комплексе с антителами. Механизм блокирующего действия заключается, в том, что противоопухолевые антитела блокируют опухолеассоциированные антигены делая ее невидимой для иммунологического надзора и препятствуют лизису Т-лимфоцитами. И связывание антител с мембранным антигеном приводит к погружению образующегося комплекса внутрь опухолевой клетки [131]. При этом ресинтез мембранного антигена не происходит, пока в среде, окружающей клетку, присутствуют антитела.

Онкологические заболевания сопровождаются различными иммунологическими дефектами [9]. Изменения активности функционального состояния иммунной системы провоцируют рост опухоли. Изучение особенностей иммунитета при злокачественной опухоли позволит спрогнозировать развитие заболевания и предотвратить появление осложнений. Опухоль сама дополнительно индуцирует иммуносупрессию, что, в частности, приводит к развитию инфекционных осложнений и неэффективности противоопухолевой иммунотерапии [36, 49, 203, 204, 213]. Доказано, что между опухолью и иммунной системой существуют взаимодействия, приводящие не только к угнетению опухоли, но и к защите от патологии и даже к стимуляции роста опухоли.

На сегодняшний день является перспективным изучение гуморального иммунитета, при онкологических заболеваниях, с целью улучшения не только диагностических критериев, но и качества терапии [50, 147].

1.4. Роль цитокинов в возникновении и прогрессировании онкологических заболеваний

Цитокины – наиболее многочисленная и функциональная группа биологически активных веществ белковой природы. Цитокины являются модификаторами широкого спектра биологических реакций. Их функции универсальны, цитокины могут как стимулировать, так и тормозить активность и дифференцировку воспалительных реакций. Могут быть эффекторами реакций и обладать цитотоксическими эффекторами. К цитокинам относятся интерлейкины, лимфокины, хемокины, факторы — стимуляторы клеток, интерфероны, факторы супрессии, факторы некроза опухолей и др. Цитокиновой регуляцией обеспечиваются пролиферация, дифференцировка, функционирование клеток, межклеточные и межсистемные взаимодействия, направление и характер иммунного ответа на внедрение патогенов инфекционного и неинфекционного генеза [73]. Цитокины усиливают апоптоз клеток, а также подавляют дифференцировку клеток. Таким образом, цитокины играют важную регуляторную и эффекторную роль в иммунном ответе. Не исключается их участие при ММ [43, 64, 92]. Цитокины продуцируются различными клетками и способны моделировать их функциональную активность, в конечном итоге влияя на иммунный ответ в целом [206].

С момента открытия с 70 г.г. XX столетия до настоящего времени выделено более 200 цитокинов, разнообразных по строению и по функциональной активности, в соответствии с чем их подразделяют на следующие группы:

-провоспалительные, функция которых мобилизовать воспалительный эффект. К ним относят ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма-интерферон;

-противовоспалительные, максимально снижающие и ограничивающие развитие воспаления, в группу которых входят ИЛ-4, ИЛ-10;

- и регуляторы клеточного и гуморального иммунитета, выполняющие функции противовирусные и цитотоксические (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма-интерферон)

Согласно решения номенклатурного комитета в 1992 г. для присвоения номера новооткрытым интерлейкинам требуется молекулярное клонирование, секвенирование и экспрессия гена интерлейкина, удостоверяющие его уникальную нуклеотидную последовательность [73].

Цитокины, являются важнейшим регуляторным механизмом межклеточных взаимодействий между иммунной системой и опухолью. В настоящее время доказано, что опухолевые клетки, подобно лимфоцитам способны вырабатывать некоторые цитокины (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма-интерферон) [94,219].

При мутации гена цитокина и утрате выполняемых им функций, его может дублировать другой цитокин, следовательно, мутация гена конкретного цитокина не приводит к развитию иммунодефицита. Кроме того, цитокины плеiotропны – действуют на различные мишени, и полифункциональны. А так же цитокины способны к взаимосвязи и взаимодействию. С одной стороны, цитокины способны действовать как индукторы иммунного ответа, с другой стороны способны подавлять выработку других цитокинов. Например, ИЛ-6, ингибирует провоспалительные цитокины, а IFN γ и IL-4 вместе подавляет выработку цитокинов, соответствующих (Th1 и Th2) групп. При прогрессировании ММ ИЛ-6 является наиболее значимым, так как способствует стимуляции и пролиферации миеломных клеток и их предшественниц [73, 202]. Высокая концентрация ИЛ-6 отмечается при агрессивном течении и прогрессировании ММ [166, 209]. Пролиферацию плазматических клеток могут стимулировать и другие цитокины (ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ 5, GM-KCF). Развитие генерализованного остеопороза, очагов костной деструкции и гиперкальциемии обусловлено действием цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6, M-KCF), которые продуцируются миеломными и стромальными клетками,

стимулированными с другой стороны, способствуют резорбции костной ткани. Цитокины ИФН- γ и α , ИЛ-4, ИЛ-2, напротив, ингибируют пролиферацию миеломных клеток [22].

Основные продуценты цитокинов являются лимфоциты, в меньших количествах их вырабатывают макрофаги и гранулоциты [105]. Интерлейкины способны опосредовать межлейкоцитарные взаимодействия цитокинов.

В частности, ИЛ-8 способен проявлять себя как фактор усиления опухолевой прогрессии, ИЛ-2 - необходим для пролиферации Т-клеток и других процессов, регулирующих тяжесть повреждения тканей, а ИЛ-4 подавляет активность макрофагов и снижает процесс биосинтеза провоспалительных цитокинов [21, 132]. Особенности цитокиновой регуляции влияют на иммунологическую защиту организма в целом. Высокая концентрация ИЛ-2, стимулирует цитотоксические Т-лимфоциты к уничтожению миеломных клеток при ММ [49].

Согласно классификации по оказываемому клиническому эффекту (Барышников А.Ю. и соавт. 2004) ИЛ-2, ИЛ-8, ФНО-альфа относят к регуляторам иммунного ответа. ИЛ-4 – участвует в гемопоэзе. ИЛ-4 и ИЛ-8 - стимулируют воспаление и участвуют в ангиогенезе, ИФН-бета – контролирует апоптоз клеток. ФНО-мультифункциональный цитокин, вырабатывается макрофагами. ФНО-альфа обладает цитотоксическим действием, иммуномодулирующим и провоспалительным эффектами, данный цитокин регулирует за апоптоз клеток, их рост и участие в воспалительных реакциях [40, 73, 139, 140].

Существует теория возникновения ММ в процессе неоангиогенеза, при этом опухолевые клетки продуцируют цитокины, сосудистый эндотелиальный ростовой фактор (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), которые стимулируют рост миеломных клеток, и запускают продукцию ИЛ-6, который вызывает прогрессирование ММ [73].

ФНО – альфа играет важную роль во взаимодействии между опухолевыми миеломными клетками и клетками стромы костного мозга. При активации данного цитокина происходит увеличение синтеза молекул адгезии на миеломных (LFA-1, VLA-4) и стромальных клетках (ICAM-1, VCAM-1). Это приводит к усилению адгезии миеломных клеток к стромальным клеткам костного мозга, и увеличению секреции ИЛ-6 костномозговым микроокружением [18, 76]. По данным В. Klein (2012г.) нарушение в синтезе ИЛ-6 ведет к увеличению числа миеломных клеток и является главным ростовым фактором опухоли [101,117, 159,180]. Избыточная продукция ИЛ-6 способствует активации и росту опухолевого клона при ММ, остеокластов и угнетает иммунный ответ организма. Так же большую роль в активации остеокластов придают увеличению взаимодействия между рецептором RANK активатора ядерного фактора – В (NF-kb), который экспрессируется остеокластами и хондроцитами. Другой макрофагальный воспалительный протеин – 1a (MIP-1a), так же является остеокластактивирующим фактором и может стимулировать пролиферацию и выживание миеломных клеток, одновременно угнетая эритропоэз при ММ.

Известны цитокины, которые способны ингибировать рост миеломных клеток. Наиболее мощным ингибитором роста плазматических клеток при ММ является интерферон -6, ИЛ-4 и интерферон-альфа.

При лечении больных злокачественными опухолями в последнее время стали применять лекарственные препараты на основе цитокинов. Которые способны корректировать функции клеток иммунной системы [130].

Таким образом, особенности цитокиновой регуляции влияют на иммунологическую защиту организма в целом. Имеются многочисленные научные данные, свидетельствующие о том, что у онкологических больных нарушается баланс проопухолевых, противоопухолевых и регуляторных цитокинов [109,111, 112, 153]. От баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в крови больного человека зависит

процесс прогрессирования онкологического заболевания и возможность возникновения инфекционных осложнений.

1.5. Роль нейтрофильных гранулоцитов в возникновении и прогрессировании онкологических заболеваний

Нейтрофильные лейкоциты (НГ) (нейтрофильные гранулоциты, или нейтрофилы) — преобладающая популяция белых клеток крови. В крови здорового человека содержится $2,0-7,5 \times 10^9$ /л нейтрофилов, что составляет 50–70% от общего числа лейкоцитов крови. Нейтрофильные гранулоциты являются классическими фагоцитами, имеют адгезивность, подвижность, способность к хемотаксису, и захватывать частицы. НГ занимают важную роль в системе гуморально-клеточной кооперации крови, экстренно реагируя на постоянство внутренней среды. При возникновении в организме воспаления нейтрофилы количественно и качественно меняют свою активность, становясь мощным эффектором, обеспечивающим механизмы каскадных реакций [131]. При воспалительном процессе на начальной стадии в крови повышается относительное, а иногда и абсолютные показатели нейтрофилов, повышается их адгезия и фагоцитарная активность. Однако в последующем - активность их угнетается [65, 169].

По литературным данным, НГ являются клеточными посредниками между организмом и опухолью, играя важную роль в обеспечении противоинфекционной защиты и регуляции функциональной активности клеток иммунной системы, а также отвечают за развитие воспалительных процессов [14, 78]. Злокачественная опухоль неоднозначно влияет на функцию НГ, уменьшает их хемотаксическую активность. Особенности функциональной активности нейтрофилов зависят от типа, локализации и стадии онкологического заболевания.

Цитотоксическая активность НГ опосредована протеолитическими ферментами, содержащимися в специфических гранулах. При активации НГ

происходит «кислородный взрыв» и образование АФК, которые включают высокореактивные свободные радикалы, ионы кислорода и кислородсодержащие химические группы. Образование АФК происходит в мембране фаголизосом, за счет инициации фермента NADPH-оксидазы (NADPH - восстановленная форма никотинамиддинуклеотидфосфата), называемой также оксидазой фагоцитов (Phox). Сборка и активация NADPH-оксидазы происходит в клеточной мембране примыкающей к зоне контакта с фагоцитируемым объектом. «Кислородный взрыв» способен развиться в течении секунд, что дает экстренную защиту на ранних этапах иммунной реакции при воспалении. Нейтрофилы – это наиболее эффективные продуценты активных форм кислорода это [78].

Хемотаксический пептид N-формил-Мет-Лей-Фен (ФМЛФ) активирует респираторный взрыв, связываясь со специфическим рецептором. Показано, что в трансдукции сигнала с рецептора ФМЛФ на NADPH оксидазу участвуют гетеротримерный G_j-белок, малые ГТФ - азы, протеинкиназа С (ПКС), каскад митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), фосфатидилинозит 3-киназа (ФИ-3-К). В результате конформационных изменений при сборке NADPH-оксидазы происходят образование супероксида — короткоживущего родоначальника активных форм кислорода. На следующем этапе реализуется цепь реакций, приводящих к образованию активных форм кислорода, обладающих более высокой бактерицидной активностью, чем супероксидантов. Под действием этих двух ферментов образуются перекись водорода и гидроксил-радикал, последний - один из сильнейших окислителей, обладающих бактерицидной активностью.

Существует метод оценки способности НГ вырабатывать активные формы кислорода во время «респираторного» взрыва. Хемилюминесцентная активность НГ на прямую коррелирует с их функциональной активностью [6, 38, 63, 33, 90, 128, 135, 176].

Противоопухолевая активность обусловлена выработкой НГ следующих активных веществ: дефенсина, АФК, протеазы, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО-альфа, ГМ-КСФ. За счет стимуляции НГ приобретает свойства, способствующие уничтожению опухолевых клеток, ингибированию ангиогенеза, привлекает и активирует дендритные клетки, макрофаги и цитотоксические Т-лимфоциты, а также приобретает антителозависимую цитотоксичность, что в целом способствует деструкции опухоли. С другой стороны, если НГ начинает вырабатывать ММП 9, ММП 13, АФК, урокиназу, ангиопоэтин или фактором роста, то НГ модифицируется, приобретая проопухолевую активность и способность к деградации внеклеточного матрикса, ангиогенезу, подавлению миграции и активности макрофагов и активации миграции опухолевых клеток, что способствует развитию и распространению опухоли. Учитывая противоречивые данные взаимоотношениях НГ со злокачественной опухолью, эти исследования продолжаются. Малоизученным остается вопрос о влиянии неспецифического звена иммунитета при прогрессировании ММ и появлении осложнений. Хотя полное излечение данного заболевания невозможно, наука ищет новые пути решения этой задачи [17, 83, 85, 110, 126].

В связи с этим является актуальным изучение молекулярных и клеточных механизмов прогрессирования и иммуногенеза у больных ММ для понимания особенностей развития заболевания и появления осложнений.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Работа производилась в гематологическом отделении Красноярской Краевой клинической больницы №1 (главный врач, Корчагин Егор Евгеньевич) и лаборатории клинической патофизиологии и аллергологии ФГБУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (зав. лабораторией, д.м.н., Смирнова О.В.). Контрольная группа, состоящая из 125 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с группой обследованных больных была отобрана при профилактических осмотрах в ЛПУ города Красноярска. Обследование больных и практически здоровых людей проводилось с разрешения этического комитета ФГБУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, при этом каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование.

Объектом исследования явились 101 больной ММ G-иммунохимического варианта, в возрасте от 40-76 лет. Отбор больных производился методом случайной выборки по мере поступления в гематологическое отделение Краевой клинической больницы № 1 г.Красноярска с 2011-2013г. При поступлении врачами гематологами у больных собирался анамнез, и анализировались данные объективного осмотра, отражающие их общее состояние.

Диагноз верифицировался по результатам клинического и лабораторного исследования. Идентификацию G-варианта ММ проводили методом иммунофиксации электрофореза (г.Новосибирск). Диагноз подтвержден сочетанием диагностических критериев. Степень поражения костей подтверждалась рентгенологическими исследованиями и МРТ. В рамках исследования так же были изучены 101 история болезни больных ММ G- иммунохимического варианта. Объектом исследования была венозная кров, которая бралась утром с 8 до 9 часов, натощак, из локтевой вены, в

пробирки с гепарином, при поступлении в стационар, до назначения патогенетической терапии. Динамическое наблюдение за больными осуществлялось на протяжении всего периода пребывания их в стационаре.

2.1.1 Общая характеристика обследованных пациентов

В клинико-лабораторное исследование включались больные диффузно-очаговой MM G- иммунохимического варианта до 76 лет, поступившие в отделение впервые. Все больные согласно классификации Durie, Salmon (1975 г.) были разделены на стадии. Больные МБ на II стадии характеризовались уровнем гемоглобина (Hb) — 85–100 г/л, IgG — 50–70 г/л., средним размером опухолевой массы от 0,6 кг кг/м³, уровнем кальция в сыворотке менее 12 мг/100 м, наблюдался остеолиз или солитарный костный очаг. Для больных на III стадии - максимально высокая опухолевая масса (1,2 кг/м³), гемоглобин ниже 85 г/л, уровень кальция в сыворотке более 12 мг/100 мл, выраженный остеодеструктивный процесс, высокий уровень M-компонента (IgG менее 70 г/л, IgA менее 50 г/гл, VJ в моче менее 12 г/сут). На каждой стадии было выделено дополнительно две подгруппы: А- без поражения почек, В- с поражением почек (Рис.2).

Деление на А или В варианты в зависимости от функции почек проводилось в зависимости от содержания креатинина в сыворотке крови. Так если функции почек снижены, то больных относили в В стадию. I А, II А, III А — содержание креатинина в сыворотке крови < 177 ммоль/л. I В, II В, III В — содержание креатинина в сыворотке крови > 177 ммоль/л. Почечные осложнения являются наиболее серьезными и частыми проявлениями на стадиях и являются одной из причин смерти пациентов [10, 89, 97].

<i>СТАДИЯ</i>	<i>КРИТЕРИИ</i>	<i>ИЗМЕРЕННАЯ МАССА МИЕЛОМНЫХ КЛЕТОК (МЛРД КЛЕТОК/М²)*</i>
СТАДИЯ I (низкая клеточная масса)	<i>Все нижеследующие:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Уровень гемоглобина более 10 г/дл • Уровень кальция в сыворотке нормальный или менее 10,5 мг/дл • Рентгенограмма костей показывает нормальную костную структуру (уровень 0) либо только солитарную плазмацитому • Низкие уровни продукции М-компонента (уровень IgG <5 г/дл, уровень IgA <3 г/дл) • В моче при электрофорезе М-компонент легких цепей <4 г/24 часа. 	600 млрд.*
СТАДИЯ II (промежуточная клеточная масса)	<i>Не соответствует критериям ни стадии I, ни стадии III</i>	от 600 до 1200 млрд.*
СТАДИЯ III (высокая клеточная масса)	<i>Один или более критериев из следующих:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Уровень гемоглобина <8,5 г/дл • Уровень кальция в сыворотке более 12 мг/дл • Запущенные литические костные повреждения (уровень 3) • Высокие уровни продукции М-компонента (уровень IgG >7 г/дл, уровень IgA >5 г/дл) • Белок Бенс-Джонса >12 г/24 часа 	>1200 млрд.*
СУБКЛАССИФИКАЦИЯ (или А, или В)	<ul style="list-style-type: none"> • А: относительно нормальная функция почек (уровень креатинина в сыворотке <2,0 мг/дл) • В: нарушенная функция почек (уровень креатинина в сыворотке >2,0 мг/дл) <i>Примеры: Стадия IA (низкая клеточная масса с нормальной функцией почек). Стадия IIIB (высокая клеточная масса с нарушенной функцией почек).</i>	

Рис.2 Определение стадий ММ по Durie и Salmon (1975г.)

Средний возраст больных ММ составил $60,53 \pm 6,78$ лет. Среди 101 обследованных больных ММ - мужчин 39 %, женщин 62%. Средний возраст мужчин составлял – 60 лет $\pm 2,3$ года (от 47 до 73 лет), женщин – 61 год $\pm 3,7$ года (от 43 до 76 лет) (рис.2). При поступлении у 16 (16,16%) выявлялись поражения почек, на II стадии 8 больных, на III так же 8 больных [184]. У 93 человек (93,93%) – имелись очаги деструкции в костях. За период клинического наблюдения в гематологическом отделении у 46% развились инфекционные осложнения.

Соотношение мужчин и женщин по стадиям составило: IA стадия – 58 больных из них 42 женщины и 16 мужчин, на IIIA стадии – 27 больных, из них 14 женщин и 13 мужчин. С поражениями почек на IIIB стадии – 8

больных, из которых 4 женщины и 4 мужчины, на IIIВ стадии – 8 больных, из них 2 женщины и 6 мужчин (рис.3).

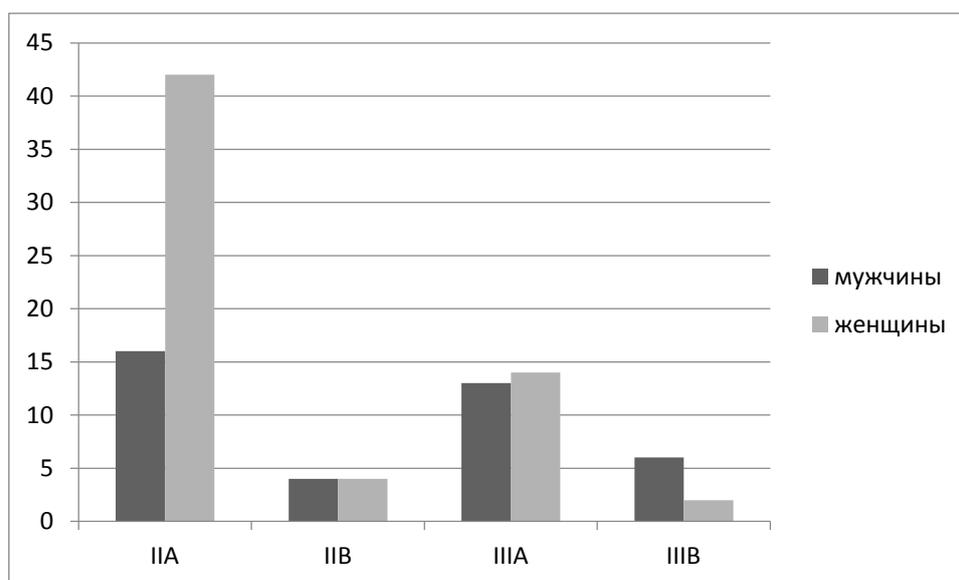


Рис. 3 Распределение наблюдаемых больных ММ в зависимости от стадии и от пола больных

Больные в возрасте 40-50 лет составили – 10 человек, 51-60 лет – 37 человек, 61-70 лет – 41 человек, 71-76 лет – 13 человек. Распределение больных по возрасту показало, что на II стадии заболевания находились 65,65% исследуемых больных, а на III стадии 35,35%. Возрастные данные соответствует литературным описаниям и подтверждает, что ММ относится к болезням пожилого возраста (Табл.1).

Таблица 1

Распределение больных по возрасту на разных стадиях заболевания при ММ

Стадия заболевания	Число больных	Возраст в годах			
		33-50	51-60	61-70	70-76
II	66	8	26	24	8
III	35	2	11	17	5
Всего:	101	10,1%	37,37%	41,41%	13,13%

Иммунологические исследования проводились на базе лаборатории клинической патологической физиологии и аллергологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (зав. лабораторией, д.м.н., Смирнова О.В.).

Анализ полученных результатов проводился по группам в зависимости от стадии и осложнений течения заболевания (Табл.2). Характеристика групп дается по ходу изложения материала.

Таблица №2

Объём выполненных исследований

Методы исследования	Здоровые	Больные	Всего
	1	2	3
Клинико -анамнестический	125	101	226
Иммунный статус методом непрямой иммуофлуоресценции с помощью моноклональных антител: CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD16 ⁺ , CD19 ⁺ , HLA-DR ⁺	125	101	226
ИФА, количественное определение иммуноглобулинов иммуноферментным методом (А, М, G, Е)	125	101	226
Хемилюминесцентный анализ активности нейтрофильных гранулоцитов	125	101	226
ИФА, количественный анализ провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма-интерферон), и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4)	125	101	226

Всего было произведено 1356 лабораторных исследований.

2.2.2. Иммунологические методы исследования

Метод иммунофенотипирования (ИФТ) широко применяется для диагностики заболеваний, оценки эффективности терапии и выявления минимальной остаточной болезни [56].

При исследовании иммунного статуса применялся метод непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител к CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺, HLA-DR⁺. (ОО «Сорбент» г.Москва). Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли соотношение (CD4⁺/CD8⁺), лейко-Т-клеточный (Лейкоциты /CD3⁺), лейко-В-клеточный (Лейкоциты/CD19⁺) индексы, а также индекс активации Т-лимфоцитов (HLA-DR⁺/CD19⁺) (Земсков А.М., Земсков В.М., 1994).

Выделение лимфоцитов производили центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографин ($\rho=1,077$) по методу A.Boyum (1968). Концентрацию лимфоцитов подсчитывали в камере Горяева. При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определялась чистота выхода лимфоцитов, которая составляла не менее 97%, жизнеспособность лимфоцитов соответствовала 98-100%. Выделенные лимфоциты использовали для определения иммунного статуса. Отмытые лимфоциты инкубировали с тестируемым моноклональным антителом 45 минут при $t+40C^0$. Дважды отмывали в растворе Хенкса и затем инкубировали с ФИТЦ-мечеными антителами 30 минут при $t+40C^0$. После того как клетки отмыли, они готовы для наблюдения. Окрашенные клетки просматривались с помощью флуоресцентного микроскопа под водной иммерсией. Количество антиген позитивных клеток определяли, как процент флуоресцирующих клеток, при просматривании 100 лимфоцитов за вычетом процента флуоресцирующих клеток, наблюдаемых в препарате отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля использовали препараты, подготовленные аналогичным образом, за исключением того, что вместо моноклональных антител клетки обрабатывали раствором Хенкса.

Концентрацию иммуноглобулинов классов А, М, Е и G в сыворотке крови определяли иммуноферментным анализом (ИФА). Состояние гуморального звена иммунитета оценивали по уровням относительного синтеза IgA (IgA/CD19⁺), IgE (IgE/CD19⁺), IgG (IgG/CD19⁺), IgM (IgM/CD19⁺) (Земсков А.М., Земсков В.М., 1994). Уровни ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма интерферон в сыворотке крови больных и здоровых лиц определяли с так же ИФА с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Используемый твердофазный метод иммуноанализа основан на принципе «сэндвича». Анализ проводится в две стадии. На первой стадии используют калибровочные пробы с известной концентрацией Ig (А,М,G) и исследуемые образцы инкубируются в лунках стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами (МКАТ) к Ig (А,М,G). Затем планшет отмывается. На второй стадии связавшийся в лунках Ig (А,М,G) обрабатывают конъюгатом МКАТ к Ig (А,М,G) с пероксидазой (конъюгат МКАТ и иммобилизованные в лунках планшета МКАТ специфичны к разным участкам молекулы Ig (А,М,G). После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «иммобилизованные МКАТ – Ig (А,М,G) - конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (ортофенилендиамина). Интенсивность окраски хромогена пропорциональна концентрации Ig (А,М,G) в анализируемом образце. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом результаты учитываются фотометрически. Концентрацию Ig (А,М,G) в пробах определяют по калибровочному графику. Уровни содержания цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма-интерферон) изучались ИФА с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

2.2.3. Хемиллюминесцентный анализ нейтрофильных гранулоцитов

В качестве метода изучения активности нейтрофильных гранулоцитов использовался хемилюминесцентный анализ спонтанной и индуцированной продукции АФК НГ больных ММ в зависимости от стадии заболевания (De sole p.et al.; 1983). Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе “CL 3606”(Россия). Регистрация результатов и управление анализатором осуществлялись через персональный компьютер. Определялись следующие характеристики: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции (T_{max}), максимальное значение интенсивности хемилюминесценции (I_{max}), площадь кривой хемилюминесценции (S). В качестве усилителя хемилюминесценции использовали люминол. Индуктором респираторного взрыва служил опсонизированный зимозан. Усиление хемилюминесценции, индуцированной опсонизированным зимозаном, оценивали по соотношению площади индуцированной ($S_{инд}$) к площади спонтанной ($S_{спонт}$) хемилюминесценции и обозначали индексом активации. По результатам проведенных исследований была сформирована база данных.

2.2.4. Статистические методы исследования

По результатам исследования на персональном компьютере в пакете электронных таблиц MSExcel 2010 была сформирована база данных. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ StatisticaforWindows 8.0 (StatSoftInc., США, 2008) и MicrosoftExcel, 2007 (Microsoft, США) Для всех данных, определяли медиану (Me) и персентиля (C_{25} - C_{75}). [87]. Оценка достоверности различий средних осуществляли с использованием t - критерия Стьюдента. Обработка полученных данных включала подсчет непараметрических данных: Качественные переменные были описаны абсолютными значениями и в виде процентных долей. Статистическую значимость различий определяли с

использованием рангового критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверки статистических гипотез принимался равным $p < 0,05$.

Для определения корреляционных связей использовали метод Спирмена, так как, по крайней мере, одно из распределений анализируемых количественных признаков не является нормальным.

При значении коэффициента корреляции $|r| \geq 0,75$ связь между признаками оценивалась как сильная, при коэффициенте $0,25 < |r| < 0,75$ – зависимость средней силы, при $|r| \leq 0,25$ – слабая степень корреляции. При сравнении признаков, характеризующих частоту, использовался точный критерий Фишера[87].

Для определения наиболее значимых показателей гуморального, клеточного и неспецифического звена иммунитета, а также для определения отличий для цитокинов, и оценки равномерности исследуемых показателей в контрольной группе и больных людей нами применен дискриминантный анализ. Дискриминантный анализ проводился с использованием пошагового метода (F-критерий Фишера). Анализировали группы, сформированные классификатором при дискриминантном анализе, по непараметрическим показателям. Для интерпретации результатов дискриминантного анализа использовали Wilk's Lambda — лямбда Уилкса (статистика Уилкса), Partial Lambda — частная лямбда, F-remove — F-критерий и Toler. — толерантность.

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

3.1. Особенности клеточного звена иммунитета у больных множественной миеломой в зависимости от стадии заболевания

Множественная миелома – это гематологическое заболевание, лимфоидная опухоль низкой степени злокачественности.

При исследовании состояния клеточного звена иммунитета у больных ММ показатели общего количества лейкоцитов, относительного и абсолютного значения лимфоцитов не отличалось от показателей контрольной группы.

Уровни относительного и абсолютного количества $CD3^+$ - клеток при ММ статистически значимо снижены на всех стадиях заболевания, что обуславливает развитие клеточного иммунодефицита при данном состоянии ($p < 0,001$).

Количество абсолютных $CD4^+$ - клеток статистически значимо повышено на II стадии заболевания по сравнению с контролем ($p < 0,001$), при этом на III стадии статистически значимых изменений не наблюдаются.

У больных ММ выявлено статистически значимое увеличение относительного уровня $CD8^+$ - клеток на всех стадиях заболевания ($p < 0,001$), относительно контроля, что свидетельствует об активации цитотоксического звена клеточного иммунитета.

У больных ММ обнаружено достоверное снижение абсолютного значения $CD16^+$ -клеток на всех стадиях заболевания, по сравнению с контролем ($p < 0,001$) (Табл.3).

Таблица №3

Состояние клеточного звена иммунитета у больных ММ в зависимости от стадия заболевания (Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 (1)		Стадия II, N=65 (2)		Стадия III, N=35 (3)	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
Лейкоциты, (10 ⁹ /л)	5,7	4,82 – 7,47	4,4	3,7 - 5,1	4,5	3,9 – 5,5
Лимфоциты, (%)	38,2	32,2-44,9	28,0	23,00 – 34,00	29,00	25,00– 45,00
Лимфоциты, (10 ⁹ /л)	2,05	1,52-3,44	1,30	1,00 – 1,75	1,3	1,13 – 2,10
CD3 ⁺ , (%)	66	60,0 – 72,0	36	30 – 46	48	25 – 57
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
CD3 ⁺ , (10 ⁹ /л)	1,19	0,94-2,46	0,43	0,31 – 0,68	0,51	0,60 – 0,33
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
CD4 ⁺ , (%)	45,0	34,0 – 48,75	65	54-69	56	40-65
			p ₁ <0,001			
CD4 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,70	0,50– 1,76	0,85	0,56-1,14	0,61	0,41-1,26
			p ₁ <0,001		p _{1,2} <0,001	
CD8 ⁺ , (%)	27,0	20,0 – 33,75	41	31 – 55	47	21 – 67
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
CD8 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,50	0,30 – 1,11	0,48	0,33 – 0,73	0,75	0,78 – 0,27
CD16 ⁺ , (%)	20,0	17,0 – 23,0	21	15,0– 37,0	20	11,0 – 31,0
CD16 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,38	0,26 – 0,85	0,27	0,17 – 0,49	0,25	0,13 – 0,58
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,017	
CD19 ⁺ , (%)	13,5	9,0 – 15,75	24	14 – 31	30	20 – 41
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	
CD19 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,25	0,15-0,57	0,24	0,16 – 0,55	0,40	0,27 – 0,88
					p ₁ <0,023; p ₂ <0,004	
HLA-DR ⁺ , (%)	15,00	12,00 - 20,00	14,00	11-17	14,00	12-22
HLA-DR ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,26	0,17-0,68	0,19	0,1-0,28	0,23	0,15-0,4

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/– с показателями больных на II стадии

У больных ММ на II стадии отмечается статистически значимое увеличение относительного количества CD19⁺-клеток, относительно контроля, что подтверждает ММ относится к В-лимфопролиферативным заболеваниям, однако на III стадии отмечается статистически значимое увеличение относительно II стадии ($p < 0,001$) и относительно контрольной группы ($p < 0,001$). Абсолютное значение CD19⁺-клеток статистически значимо увеличивается только на III стадии заболевания относительно II стадии заболевания ($p < 0,004$) и контрольной группы ($p < 0,23$).

Нарушено соотношение между CD4⁺-клетками и цитотоксическими лимфоцитами на всех стадиях заболевания, что свидетельствует об отсутствии сбалансированности клеточных звеньев иммунитета в противоопухолевой защите организма ($p < 0,001$) (Табл.4).

Таблица №4

Состояние показателей клеточного звена иммунитета у больных ММ в зависимости от стадия заболевания (Me, C₂₅-C₇₅,

p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 (1)		Стадия II, N=65 (2)		Стадия III, N=35 (3)	
Лейкоциты/CD3 ⁺	4,06	3,06-5,46	10,4	7,5-14,24	8,65	5,19-13,59
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
Лейкоциты/CD19 ⁺	19,23	14,58-32,43	18,31	9,03-27,78	12,41	6,42-18,38
			p ₁ <0,046		p ₁ <0,001; p ₂ <0,003	
HLA-DR ⁺ /CD19 ⁺	1,21	1,07-1,55	0,62	0,39-1	0,46	0,27-0,73
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,58	1,28-1,72	0,87	0,75-1,47	0,97	0,39-1,48
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂-/- с показателями больных на II стадии

На всех стадиях с поражением почек отмечается статистически значимое снижение CD3⁺- клеток относительно контрольной группы, при том на ПБ значения так же были статистически значимо снижены относительно ПА стадии (p<0,024) (Табл.4). На стадии с поражением почек статистически значимые различия наблюдаются в абсолютном значении CD4⁺- клеток у больных ММ на ПБ и ШВ стадии относительно контрольной группы (p<0,001). У больных ММ с поражением почек на ПБ стадии наблюдается статистически значимое увеличение относительного уровня CD8⁺- клеток (p<0,001), на ШВ стадии относительный уровень CD8⁺- клеток статистически значимо увеличивался по сравнению со стадией ША (p<0,048) и контрольной группой (p<0,001). На стадиях с поражением почек на ПБ и ШВ выявлено статистически значимое повышение абсолютного значения CD16⁺- клеток по сравнению с контрольной группой. На стадиях с поражением почек статистически значимые различия выявлены на ПБ и ШВ по сравнению с контрольной группой (p<0,001). Нарушено соотношение между CD4⁺-клетками и цитотоксическими лимфоцитами на всех стадиях с поражением почек (p<0,001) (Табл.5, 6, 7, 8).

Таблица №5

Состояние клеточного звена иммунитета у больных ММ на II стадии с поражением почек и без
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 (1)		Стадия ПА, N=57 (2)		Стадия ПБ, N=8 (3)	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
Лейкоциты, (10 ⁹ /л)	5,7	4,82 – 7,47	4,4	3,7-5	4,4	3,35-6,15
Лимфоциты, (%)	38,2	32,2-44,9	28	23-34	28,5	22,5-37
Лимфоциты, (10 ⁹ /л)	2,05	1,52-3,44	1,27	1-1,72	1,36	0,96-1,88
CD3 ⁺ , (%)	66	60,0 – 72,0	34	28-46	43	40-51,5
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001, p ₂ <0,024	
CD3 ⁺ , (10 ⁹ /л)	1,19	0,94-2,46	0,41	0,29-0,68	0,63	0,46-0,85
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
CD4 ⁺ , (%)	45,0	34,0 – 48,75	65	61-69	49,5	45-77
			p ₁ <0,001		p ₂ <0,001	
CD4 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,70	0,50– 1,76	0,87	0,61-1,14	0,77	0,47-0,93
CD8 ⁺ , (%)	27,0	20,0 – 33,75	41	30-51	58	48-60
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
CD8 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,50	0,30 – 1,11	0,47	0,33-0,65	0,8	0,45-1,11
CD16 ⁺ , (%)	20,0	17,0 – 23,0	20	15-31	40	38-40
					p ₁ <0,001	
CD16 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,38	0,26 – 0,85	0,25	0,17-0,44	0,52	0,37-0,74
					p ₁ <0,001	
CD19 ⁺ , (%)	0,25	0,15-0,57	0,22	0,16-0,55	0,4	0,17-0,55
CD19 ⁺ , (10 ⁹ /л)	13,5	9,0 – 15,75	20	13-33	28	23-29
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
HLA-DR ⁺ , (%)	15,00	12,00 - 20,00	14	11-17	14	11-18,5
HLA-DR ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,26	0,17-0,68	0,19	0,1-0,28	0,21	0,12-0,35

Таблица №6

Состояние показателей клеточного звена иммунитета у больных ММ на II стадии с поражением почек и без
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 (1)		Стадия ПА, N=57 (2)		Стадия ПБ, N=8 (3)	
Лейкоциты/CD3 ⁺	4,06	3,06-5,46	10,8	8-14,28	7,43	5,86-9,54
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
Лейкоциты/CD19 ⁺	19,23	14,58-32,43	19,61	9,03-29,58	13,31	9,72-19,57
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,015	
HLA-DR ⁺ /CD19 ⁺	1,21	1,07-1,55	0,6	0,39-1,13	0,6	0,44-0,77
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,58	1,28-1,72	0,85	0,7-1,5	0,96	0,91-1,16
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/- с показателями больных на ПА стадии

Таблица №7

Состояние клеточного звена иммунитета у больных ММ на III стадии с поражениями почек и без (Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 (1)		Стадия IIIA, N=27 (2)		Стадия IIIB, N=8 (3)	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
Лейкоциты, (10 ⁹ /л)	5,7	4,82 – 7,47	4,5	3,7-9,1	5,05	4,6-5,5
Лимфоциты, (%)	38,2	32,2-44,9	26	25-45	32,5	26,5-41,5
Лимфоциты, (10 ⁹ /л)	2,05	1,52-3,44	1,34	1,13-2,1	1,79	1,03-2,25
CD3 ⁺ , (%)	66	60,0 – 72,0	48	3,-55	49	19,5-63
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,013	
CD3 ⁺ , (10 ⁹ /л)	1,19	0,94-2,46	0,51	0,29-0,78	0,53	0,34-1,32
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
CD4 ⁺ , (%)	45,0	34,0 – 48,75	45	39-65	61	56,5-63,5
					p _{1,2} <0,001	
CD4 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,70	0,50– 1,76	0,53	0,41-1,26	1,13	0,46-1,45
CD8 ⁺ , (%)	27,0	20,0 – 33,75	41	20-64	56	49,5-72,5
			p ₁ <0,007		p ₁ <0,001; p ₂ <0,049	
CD8 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,50	0,30 – 1,11	0,48	0,17-1,02	1	0,65-1,33
CD16 ⁺ , (%)	20,0	17,0 – 23,0	19	10-30	30,5	21-45,5
					p ₁ <0,023	
CD16 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,38	0,26 – 0,85	0,23	0,13-0,53	0,55	0,17-1
			p ₁ <0,005			
CD19 ⁺ , (%)	0,25	0,15-0,57	30	25-41	30	18-43
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
CD19 ⁺ , (10 ⁹ /л)	13,5	9,0 – 15,75	0,4	0,26-0,95	0,46	0,32-0,8
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
HLA-DR ⁺ , (%)	15,00	12,00 - 20,00	17	12-32	16	13-25
HLA-DR ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,26	0,17-0,68	0,22	0,15-0,4	0,29	0,13-0,46

Таблица №8

Состояние показателей клеточного звена иммунитета у больных ММ на III стадии с поражениями почек и без
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 (1)		Стадия IIIA, N=27 (2)		Стадия IIIB, N=8 (3)	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
Лейкоциты/CD3 ⁺	4,06	3,06-5,46	10,14	6,13-12,82	8,63	4,36-15,31
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,003	
Лейкоциты/CD19 ⁺	19,23	14,58-32,43	12,5	6,42-18,52	9,51	6,26-15,51
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,003	
HLA-DR ⁺ /CD19 ⁺	1,21	1,07-1,55	0,46	0,25-0,73	0,47	0,35-0,77
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,58	1,28-1,72	0,97	0,75-1,84	0,75	0,31-1,24
			p ₁ <0,003		p ₁ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/- с показателями больных на IIIB

На всех стадиях заболевания ММ статистически значимо снижается абсолютный уровень CD16⁺- клеток относительно контроля, что подтверждает снижение активности НК-клеток в противоопухолевом иммунитете при данном состоянии. Лейко-Т-клеточный показатель статистически значимо увеличивается на всех стадиях заболевания, а индекс активации Т-лимфоцитов статистически значимо снижается также на всех стадиях ММ относительно контроля, что еще раз подтверждает развитие Т-клеточного иммунодефицита, обусловленного снижением CD3⁺-клеток у больных. Лейко-В-клеточный показатель наоборот статистически значимо снижается на всех стадиях ММ относительно контроля, особенно значительно на III стадии заболевания, что свидетельствует об активации В-клеточного звена иммунной системы.

На II стадии мы выявили следующие особенности - наблюдается статистически значимое снижение относительного и абсолютного числа CD3⁺-клеток, статистически значимое увеличение относительного числа CD4⁺-клеток, статистически значимое увеличение относительного значения CD8⁺-клеток, абсолютного значения CD16⁺-клеток, относительного значения CD19⁺- клеток и статистически значимое снижение соотношения CD4/CD8. CD4/CD8 – это интегральный показатель, в норме у здоровых людей он составляет от 1,5 до 2,5. При ММ этот показатель ниже 1, что говорит о наличии иммунодефицита, и о несбалансированности между соотношением клеток, отвечающих за иммунный ответ

На III стадии наблюдается статистически значимое снижение относительного и абсолютного числа CD3⁺-клеток, статистически значимое увеличение относительного значения CD8⁺-клеток, абсолютного значения CD16⁺-клеток, относительного и абсолютного значения CD19⁺- клеток и статистически значимое снижение соотношения CD4/CD8.

При стадиях с поражением почек у больных регистрировались на II стадии следующие особенности - наблюдается статистически значимое снижение относительного и абсолютного числа CD3⁺-клеток, статистически

значимое увеличение относительного числа CD4⁺-клеток, статистически значимое увеличение относительного значения CD8⁺-клеток, абсолютного значения CD16⁺-клеток, относительного значения CD19⁺- клеток и статистически значимое снижение соотношения CD4/CD8.

На III стадии с поражением почек наблюдается статистически значимое снижение относительного и абсолютного числа CD3⁺-клеток, статистически значимое увеличение относительного значения CD8⁺-клеток, абсолютного значения CD16⁺-клеток, относительного и абсолютного значения CD19⁺-клеток и статистически значимое снижение соотношения CD4/CD8.

Таки образом, у больных ММ вне зависимости от стадии заболевания наблюдается статистически значимое снижение зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), CD4⁺- клеток, NK-клеток при повышении В-лимфоцитов, снижение соотношения CD4/CD8 лимфоцитов за счет увеличения последних и увеличение цитотоксических лимфоцитов.

При изучении корреляционной зависимости между величиной IgG и особенностями клеточного звена иммунитета обнаружили зависимость средней силы положительную связь ($r=0,395$) между IgG и относительным содержанием CD19⁺-клеток при уровни достоверности $p < 0,001$. Обнаружили средней силы отрицательную связь ($r=-0,279$) между IgG и соотношением лейко-В-клеточным коэффициентом (лейкоциты/CD19⁺). Зарегистрировали зависимость средней силы отрицательную связь ($r=-0,359$) между IgG и соотношением CD4/CD8 при уровне достоверности $p < 0,001$. У больных ММ с поражением почек наблюдались аналогичные изменения. При иммунохимическом G-варианте ММ уровень содержания в крови IgG является патогномичным, поэтому мы изучали корреляционную зависимость особенностей клеточного звена иммунитета от уровня IgG.

Таким образом, у больных ММ наблюдаются молекулярно-клеточные нарушения в Т –клеточном звене иммунитета. По мере прогрессирования заболевания усугубляется дисбаланс CD4⁺-клеток к цитотоксическим лимфоцитам, нарастают признаки недостаточности В-лимфоцитарного звена.

Уровень NK-клеток снижается на всех стадиях заболевания. Уменьшается индекс соотношения CD4/CD8. Изменения в клеточном звене иммунитета не зависят от стадии заболевания и поражения почек. Наиболее значимыми факторами в клеточном звене иммунитета для прогрессирования ММ являются соотношения CD4/CD8.

3.2. Особенности гуморального звена иммунитета больных множественной миеломой в зависимости от стадии заболевания

При ММ нарушается образование антител, появляются и накапливаются патологические иммуноглобулины, вероятно, этим объясняется предрасположенность больных ММ к инфекционным заболеваниям и осложнениям. Инфекционные болезни у больных ММ занимают 2-3 место среди всех осложнений, и 1 место – среди причин смерти при данном заболевании [68, 98]. В связи с этим мы решили изучить особенности гуморального звена иммунитета больных ММ в зависимости от стадии заболевания.

При исследовании состояния гуморального звена иммунитета установлено, что по мере прогрессирования заболевания у больных наблюдаются изменения в продуцировании иммуноглобулинов основных классов относительно контрольного диапазона. При этом, увеличение сывороточной концентрации IgG на всех стадиях заболевания независимо от степени поражения почек, относительно контроля, является диагностическим критерием ММ – G иммунохимического варианта [79].

Выявлено статистически значимое увеличение концентрации IgG и индекса его относительного синтеза на всех стадиях заболевания относительно контрольной группы, и на III стадии заболевания относительно II стадии ($p < 0,001$). Зарегистрировано статистически значимое снижение концентрации IgE и уровня его относительного синтеза на всех стадиях заболевания, относительно контрольной группы ($p < 0,001$) (Табл.9).

Таблица №9

Состояние гуморального звена иммунитета у больных ММ в зависимости от стадии заболевания
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 (1)		Стадия II, N=65 (2)		Стадия III, N=35 (3)	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
IgA, (г/л)	1,9	1,25 – 3,17	1,8	1-2,5	2,0	0,5-2,5
IgM, (г/л)	1,2	0,50 – 1,80	1,0	0,5-2,0	1,0	0,5-1,5
IgG, (г/л)	10,0	8,0 – 14,0	24,5	6,0-26,0	72,0	58,0-109,0
			p ₁ <0,007		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	
IgE, (МЕ/мл)	50,0	10,0-70,0	12,0	6,0-40,0	10,0	4,0-30,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
IgA/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	6,88	4,41-9,76	1,72	0,92-2,68	1,5	0,8-2,39
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
IgM/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	3,62	2,72-6,05	3,63	1,23-9,44	2,20	0,88-3,72
					p ₁ <0,001; p ₂ <0,019	
IgE/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	135,68	91,18-181,22	14,04	6,50-39,47	12,8	4,27-31,33
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
IgG/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	36,73	25,56-54,48	21,11	4,27-33,68	88,76	48,1-230,4
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/- с показателями больных на II стадии.

Остаются неизменными концентрации иммуноглобулинов IgA и IgM на всех стадиях заболевания. На II стадии заболевания MM регистрировались статистически значимые изменения иммуноглобулинов - увеличивалась концентрация IgG, и уровня относительного синтеза IgG/CD19⁺, и статистически значимо уменьшалась концентрация IgE и уровней относительного синтеза IgA/CD19⁺, IgE/CD19⁺.

При анализе гуморального звена иммунитета у больных MM с поражением почек выявлено статистически значимое повышение концентрации IgG на IIВ стадии относительно контрольной группы и стадии IIА заболевания ($p < 0,001$). Выявлено статистически значимое снижение IgE на IIВ стадии заболевания относительно IIА стадии ($p < 0,001$). Выявлено статистически значимое увеличение продукции IgG на IIВ стадии заболевания относительно контрольной группы и стадии IIIА заболевания ($p < 0,001$) и статистически значимое снижение IgE относительно контрольной группы и стадии IIIА заболевания ($p < 0,001$). Выявлено статистически значимое понижение уровней относительного синтеза IgA/CD19⁺ на IIВ стадии заболевания относительно контрольной группы. Выявлено статистически значимое понижение уровней относительного синтеза IgE/CD19⁺ на IIВ стадии заболевания по сравнению с IIА стадией заболевания и контрольной группой. Регистрируется статистически значимое понижение уровней относительного синтеза IgM/CD19⁺ на IIВ стадии заболевания по сравнению со стадией IIА заболевания ($p < 0,001$). Регистрируется статистически значимое повышение уровней относительного синтеза IgG/CD19⁺ на IIВ стадии заболевания по сравнению со стадией IIА заболевания ($p < 0,001$) (Табл.10). Регистрируется статистически значимое понижение уровней относительного синтеза IgA/CD19⁺, IgE/CD19⁺ на IIВ стадии заболевания относительно IIIА стадии заболевания и контрольной группы ($p < 0,001$) (Табл.11).

Таблица №10

Состояние гуморального звена иммунитета у больных ММ на II стадии с поражением почек и без
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 (1)		Стадия ПА, N=57 (2)		Стадия ПБ, N=8 (3)	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
IgA, (г/л)	1,9	1,25 – 3,17	1,8	1,0-2,0	1,9	1,3-2,5
IgM, (г/л)	1,2	0,50 – 1,80	1,0	0,5-2,0	1,0	0,75-1,0
IgG, (г/л)	10,0	8,0 – 14,0	20,0	6,0-25,0	44,5	34-50
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	
IgE, (МЕ/мл)	50,0	10,0-70,0	10,0	6,0-30,0	45,0	7,5-65
			p ₁ <0,001		p ₂ <0,001	
IgA/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	6,88	4,41-9,76	1,69	0,86-2,92	2,0	1,36-2,47
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
IgM/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	3,62	2,72-6,05	4,43	1,23-10	2,16	1,27-6,08
					p ₂ <0,001	
IgE/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	135,68	91,18-181,22	13,33	6,49-29,69	43,36	8,34-54,14
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	
IgG/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	36,73	25,56-54,48	16,67	4,24-32,5	43,74	29,39-54,54
			p ₁ <0,001		p ₂ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/- с показателями больных на ПА стадии.

Таблица №11

Состояние гуморального звена иммунитета у больных ММ на III стадии с поражением почек и без
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 (1)		Стадия IIIA, N=27 (2)		Стадия IIIB, N=8 (3)	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
IgA, (г/л)	1,9	1,25 – 3,17	2,0	1,26-2,5	0,75	0,5-2,5
IgM, (г/л)	1,2	0,50 – 1,80	1,0	0,5-1,5	1,0	0,5-1,5
IgG, (г/л)	10,0	8,0 – 14,0	71,0	55,0-740,	127,5	111,0-136,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	
IgE, (МЕ/мл)	50,0	10,0-70,0	5,0	4,0-15,0	30,0	20,0-60,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	
IgA/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	6,88	4,41-9,76	1,17	0,8-2,4	2,4	1,0-5,67
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	
IgM/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	3,62	2,72-6,05	1,95	1-4,08	1,7	0,89-4,6
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
IgE/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	135,68	91,18-181,22	10,25	2,05-29,25	88,47	52,34-118,63
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	
IgG/CD19 ⁺ , (нг/клетку)	36,73	25,56-54,48	74,67	37,33-119,92	276,18	161,6-381,12
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/– с показателями больных на IIIA стадии.

На II стадии заболевания MM регистрировались статистически значимые изменения иммуноглобулинов - увеличивались концентрации IgG, уровня относительного синтеза IgG/CD19⁺, и статистически значимо уменьшались концентрации IgE и соотношение IgA/CD19⁺, IgE/CD19⁺.

На III стадии заболевания MM регистрировались статистически значимые изменения иммуноглобулинов - увеличивались концентрации IgG, уровня относительного синтеза IgG/CD19⁺, и статистически значимо уменьшались концентрации IgE и соотношение IgA/CD19⁺, IgE/CD19⁺.

При стадиях с поражением почек наблюдается аналогичная ситуация. На IIБ стадии заболевания регистрируются статистически значимые повышения концентрации IgG, уровней относительного синтеза IgG/CD19⁺. Выявлено статистически значимое снижение IgE, уровней относительного синтеза IgA/CD19⁺, IgE/CD19⁺, IgE/CD19⁺.

На IIIБ стадии регистрировалось статистически значимое повышение синтеза IgG и уровней относительного синтеза IgG/CD19⁺. Выявлено статистически значимое снижение IgE, уровней относительного синтеза IgA/CD19⁺, IgE/CD19⁺, IgE/CD19⁺.

При изучении гуморального звена иммунитета выявили изменения в соотношении изучаемых иммуноглобулинов, что свидетельствует о наличии иммунной дисфункции по B-клеточному звену иммунитета

При изучении корреляционной зависимости между величиной IgG и особенностями гуморального иммунитета обнаружили зависимость сильной силы положительную связь ($r=0,72$) между IgG и IgG/CD19⁺, при уровне достоверности $p<0,001$. При MM наблюдаются молекулярно-клеточные нарушения в гуморальном звене иммунитета, характеризующиеся изменениями концентраций иммуноглобулинов. Наблюдается высокий уровень IgG, и снижение IgE. Увеличение сывороточной концентрации IgG на всех стадиях болезни относительно контроля является патогномоничным и подтверждают диагноз MM – G иммунохимического варианта. Наиболее

значимым фактором в гуморальном звене иммунитета при прогрессировании ММ является IgG и уровень его относительного синтеза IgG/CD19⁺.

3.3. Особенности содержания цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО-альфа, интерферон-гамма при множественной миеломе в зависимости от стадии заболевания

Важную роль в процессе созревания и дифференцировки миеломных клеток при ММ играют цитокины, являющиеся важнейшим регуляторным механизмом межклеточных взаимодействий между иммунной системой и опухолью [47]. В настоящее время известно, что многие цитокины (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма интерферон) вырабатываются как лимфоцитами, так и опухолевыми клетками.

Можно предположить, что от баланса провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-8, ФНО- альфа, интерферон-гамма) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4) в крови больного человека зависит процесс прогрессирования заболевания и возможность возникновения инфекционных осложнений. В связи с этим, одной из задач данного исследования явилось изучение особенностей цитокиновой регуляции в прогрессировании заболевания у больных ММ-G иммунохимического варианта.

Изучение уровней цитокинов в сыворотке крови больных ММ – G иммунохимического варианта и практически здоровых лиц позволило выявить статистически значимые различия по ряду показателей в исследуемых группах.

Наблюдаются статистически значимые различия уровней ФНО-альфа и интерферон-гамма. При ММ статистически значимо повышены уровни ФНО-альфа и интерферон-гамма при III стадии заболевания относительно контрольной группы ($p < 0,001$) (Таб.12).

Таблица 12

Содержание цитокинов у больных ММ в зависимости от стадии заболевания
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 1		Стадия II, N=65 2		Стадия III, N=35 3	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
ФНО-альфа (пг/мл)	0,54	0,38-0,87	0,45	0,4 – 3,0	1,0	0,4 – 4,0
					p ₁ <0,025	
ИЛ-2 (пг/мл)	1,1	0,5-3,05	8,0	6,0 – 13,0	10,0	7,0 – 15,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	
ИЛ-8 (пг/мл)	2,1	0,5-4,0	3,0	2,0 – 4,0	6,0	3,0 – 20,0
					p ₁ <0,001 p ₂ <0,011	
ИЛ-4(пг/мл)	7,0	5,6-7,8	1,0	0,5-2,0	0,6	0,2-1,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001 p ₂ <0,016	
Интерферон-гамма (пг/мл)	0,6	0,22-4,0	4,0	3,0 – 15,0	7,0	6,0 – 15,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/- с показателями больных на II стадии

Однако гамма-интерферон на III стадии заболевания так же статистически значимо повышен относительно II стадии заболевания ($p < 0,001$). Фактор некроза опухоли (ФНО-альфа) - является многофункциональным провоспалительным цитокином.

Интерферон-гамма - является активатором макрофагов и усиливает их противоопухолевую активность, участвуют в иммунном ответе организма человека, оказывает противоопухолевое, противовирусное, иммуностимулирующее, антибактериальное действие и вызывает антипролиферативный эффект по отношению к клеткам опухоли [49].

ИЛ-2 ключевой провоспалительный цитокин иммунного ответа, фактор роста Т,В- лимфоцитов, НК- клеток, стимулирует синтез других цитокинов (ИФН,ФНО-альфа). Его уровень статистически значимо увеличивается при II и III стадиях заболевания относительно контрольной группы ($p < 0,001$), и на III стадии заболевания относительно II стадии заболевания, при этом максимальное его содержание выявляется на последней стадии ММ ($p < 0,001$).

Аналогичная тенденция регистрируется с ИЛ-8, который относится к хемокинам (цитокин 3-го класса), представляет собой протеин, является самым ранним медиатором воспаления, мгновенно реагирует на внедрение инфекции в организм. Уровень ИЛ-8 значительно статистически значимо повышен на III стадии ММ относительно контрольной группы, что свидетельствует о борьбе организма с опухолью. При том уровень ИЛ-8 статистически значимо увеличивается на III стадии заболевания относительно контрольной группы и относительно II стадии заболевания.

ИЛ-4 - продукт субпопуляции активированных Т-клеток - действует через специфический рецептор, является противовоспалительным цитокином, который также регулирует рост и дифференциацию В-клеток, влияет на пролиферацию Т-клеток, резко снижается на всех стадиях относительно контроля. Минимальный уровень ИЛ-4 регистрируется на III

стадии заболевания, статистически значимо различаясь с II стадией заболевания ($p < 0,016$) и с контрольной группой ($p < 0,001$), уровень ИЛ-4 на II стадии заболевания так же статистически значимо снижен по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$).

Уровень интерферона-гамма статистически значимо повышен при III стадии заболевания относительно контрольной группы ($p < 0,001$) и II стадии заболевания ($p < 0,001$).

Так, при ММ с поражением почек и без поражения почек происходят изменения в концентрации всех исследуемых противовоспалительных и провоспалительных цитокинов (Табл.13,14). При поражении почек уровень ФНО-альфа статистически значимо повышен при IIБ и IIIВ стадии заболевания относительно контроля и на стадиях IIА и IIIА ($p < 0,001$), при этом количественно показатели цитокина на III стадии в два раза выше. При поражении почек уровень ИЛ-2 статистически значимо повышается на IIВ стадии относительно контроля ($p < 0,001$) и относительно стадии IIА ($p < 0,012$), при IIIВ стадии увеличиваясь в концентрации только по сравнению с контролем ($p < 0,001$). С поражением почек уровень ИЛ-8 статистически значимо увеличивается на IIIВ стадии относительно контрольной группы в 10 раз и стадии IIIА практически в 4 раза ($p < 0,001$). При поражении почек у больных ММ статистически значимо снижается уровень ИЛ-4 при IIВ стадии заболевания относительно контроля ($p < 0,001$), и стадии IIА ($p < 0,026$), при IIIВ стадии статистически значимо уменьшаясь в 9,3 раз по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$). При поражении почек на IIВ стадии заболевания уровень интерферона-гамма статистически значимо увеличивается относительно контрольной группы (и IIА стадии заболевания ($p < 0,001$), а на IIIВ стадии заболевания статистически значимо увеличиваясь по сравнению с IIIА стадией заболевания ($p < 0,001$) и контрольной группой ($p < 0,001$).

Таблица 13

Содержание цитокинов у больных ММ на II стадии с поражением почек и без
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 1		Стадия ПА, N=57 2		Стадия ПБ, N=8 3	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
ФНО-альфа (пг/мл)	0,54	0,38-0,87	0,45	0,4-3,0	2,5	1,25-5,5
					p ₁ <0,003 p ₂ <0,023	
ИЛ-2 (пг/мл)	1,1	0,5-3,05	8,0	6,0-13,0	15,0	10,5-15,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001 p ₂ <0,012	
ИЛ-8 (пг/мл)	2,1	0,5-4,0	3,0	3,0-4,0	2,9	1,4-4,5
			p ₁ <0,001			
ИЛ-4(пг/мл)	7,0	5,6-7,8	1,0	0,9-2,0	0,35	0,2-0,9
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001 p ₂ <0,026	
Интерферон-гамма (пг/мл)	0,6	0,22-4,0	4,0	3,0-10,0	16,0	9,5-16,5
					p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/- с показателями больных на ПА стадии

Таблица 14

Содержание цитокинов у больных ММ на III стадии с поражением почек и без
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 1		Стадия IIIA, N=27 2		Стадия IIIB, N=8 3	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
ФНО-альфа (пг/мл)	0,54	0,38-0,87	0,8	0,35-2	5,25	0,8-13,75
					p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	
ИЛ-2 (пг/мл)	1,1	0,5-3,05	10,0	7,0-15,0	14,0	7,5-15,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
ИЛ-8 (пг/мл)	2,1	0,5-4,0	6,0	3,0-8,0	25,0	2,5-85
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	
ИЛ-4(пг/мл)	7,0	5,6-7,8	0,6	0,2-1	0,75	0,3-1,5
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
Интерферон-гамма (пг/мл)	0,6	0,22-4,0	6,0	5,0-15,0	12,5	7,5-17
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/- с показателями больных на IIIB стадии

У больных на II стадии ММ содержание цитокинов ИЛ-2, ИЛ-8 статистически значимо увеличиваются, а уровень цитокина ИЛ-4 снижается относительно контрольной группы.

У больных на III стадии ММ содержание цитокинов ИЛ-2, ИЛ-8, интерферона-гамма статистически значимо увеличивается, а уровень цитокина ИЛ-4 снижается относительно контрольной группы и больных на II стадии заболевания, в уровень цитокина ФНО-альфа статистически значимо повышается только относительно контрольной группы.

При изучении корреляционной зависимости между величиной IgG и особенностями содержания цитокинов при ММ выявили средней силы положительную связь между IgG и ФНО-альфа ($r=0,420$) при $p<0,001$, средней силы положительную связь между IgG и ИЛ-8 ($r=0,444$) при $p<0,001$. Выявили средней силы положительную связь между IgG и ИЛ-2 ($r=0,459$) при $p<0,001$. Выявили средней силы положительную связь между IgG и интерферон-альфа ($r=0,420$) при $p<0,001$. А так же зарегистрировали отрицательную средней силы связь между IgG и ИЛ-4 ($r=-0,498$) при $p<0,001$.

Таким образом, при ММ наблюдаются следующие молекулярно-клеточные изменения в содержании цитокинов на разных стадиях заболевания. Наблюдается дисбаланс провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-8, ФНО-альфа, интерферон-гамма) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4), с преобладанием провоспалительных, что вероятно, не исключает их патогенетическую роль в стимуляции и росте самой опухоли, и возникновении инфекционных осложнений на всех стадиях заболевания. Установлено нарушение в цитокиновой регуляции при ММ в виде девиации клеточного иммунного ответа по Th-1 типу. Наиболее значимыми цитокинами в прогрессировании ММ являются ФНО-альфа, ИЛ-8 и ИЛ-4. У 47 больных во время клинических наблюдений при проведении патогенетической химиотерапии развились инфекционные осложнения. У 2 больных отмечалась генерализованная гнойно-септическая инфекция

(сепсис), у остальных 45 больных – местные воспалительные заболевания, такие как острая пневмония, острый бронхит, острый цистит и т.д.. И четверо человек умерли от инфекционных осложнений, несмотря на проводимую антибактериальную терапию. Смертность в группе с инфекционными осложнениями составила 1,88% и 4,04%- в общей основной группе. Инфекционные осложнения при ММ занимают 1 место среди всех причин смерти больных [98].

Возникновение ММ – сложный патогенетический процесс, отражающий взаимодействие организма с опухолью. Несостоятельность иммунного ответа в частности и противоопухолевой защиты в целом зависит от всех звеньев, принимающих в этом участие. Дисфункция регуляторного звена иммунной системы усугубляет течение заболевания, вызывая его прогрессирование. Цитокины, как регуляторы межклеточных взаимодействий в иммунной системе, способствуют активации противоопухолевого иммунного ответа, а также служат связующим звеном между иммунной и другими системами организма. Гуморальная регуляция межклеточных взаимодействий в иммунной системе опосредуется через цитокины, кроме того многие из них являются сами эффекторами иммунного ответа при опухолевых заболеваниях, при воспалительных процессах и т.д. Вот поэтому возможно использование цитокинов в качестве показателей, регулирующих иммунный ответ у больных ММ в прогнозировании инфекционных осложнений [82].

Существуют местные и генерализованные инфекционно-воспалительные процессы. Наиболее часто при ММ встречаются внебольничные пневмонии, сепсис, которые способствуют прогрессированию онкологического заболевания, значительно утяжеляя состояния больного. Даже адекватная антибактериальная терапия не всегда способствует купированию этих осложнений. От инфекционных осложнений гибнут около 50% всех больных ММ (25). Внебольничная пневмония характеризуется воспалительным поражением легочной ткани в ответ на

инфекционный агент с последующим системным и локальным выбросом цитокинов (фактора некроза опухоли-альфа, ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-1 β) и активным вовлечением в воспалительный процесс клеток врожденного иммунитета – нейтрофильных гранулоцитов. Избыточная продукция цитокинов способствует развитию системной воспалительной реакции с возникновением полиорганной недостаточности и гибелью больного. Таким образом, инфекционные осложнения являются неблагоприятным прогностическим фактором в прогрессировании ММ.

Больные, у которых рентгенологически в легких диагностировали воспалительный инфильтрат и имели три или более симптомов или признаков воспаления: кашель, отделение мокроты, одышка, боль в грудной клетке или другие признаки, подтверждающие развитие пневмонии аускультативно, относились к группе больных ММ с инфекционными осложнениями (внебольничной пневмонией).

Всем больным при поступлении собирался анамнез, оценивались клинические синдромы, измерялись пульс, кровяное давление, ЧДД, температура, проводились стандартные анализы крови (развернутый анализ крови, биохимическое исследование крови с определением мочевины, электролитов, АЛТ, АСТ, альбумин, коагуляционный профиль, С-реактивный белок. Проводилось микробиологическое исследование мокроты больных при поступлении, при выявлении возбудителя *Legionella*, ведение больных осуществлялась согласно рекомендациям BTS (Британского торакального общества, 2001, 2004).

Оценку тяжести пневмонии у больных ММ оценивали по BTS CURB-65 шкале (BritishThoracicSociety, 2004), (спутанность сознания, мочевины >7 ммоль/л, частота дыхательных движений ≥ 30 движений в минуту, кровяное давление <90 мм.рт.ст. (систолическое) и ≤ 60 мм.рт.ст. (диастолическое) и индекс тяжести пневмонии (PSI). В случаях, когда температура тела больного была ниже 36°C или выше 38°C, ЧСС более 90 ударов в минуту, ЧДД от 20 и выше в минуту или содержание артериального диоксида углерода менее 32

мм.рт.ст., число лейкоцитов в крови менее 4×10^9 в литре или более 12×10^9 в литре диагностировали септическое воспалительное заболевание [36]. У пациентов считался сепсис при наличии пневмонии и двух или более SIRS (Синдром системного ответа на воспаление, Systemic Inflammatory Response Syndrome) критериев.

Только у 30% больных ММ с острыми пневмониями диагноз подтверждался положительным микробиологическим тестом. Наиболее часто выявляемыми изолированными патогенами были *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*. Не было статистически значимых различий по микробиологическим агентам у больных ММ на II и III стадиях.

Не было статистически значимых различий по тяжести острой пневмонии между больными ММ на II и III стадиях (31,5% по сравнению с 37,5%; $p=0,1$ с CURB-65 шкале ≥ 3). С реактивный белок был выше у пациентов ММ на II стадии, чем у больных на III стадии (183 mgL^{-1} по сравнению с 143 mgL^{-1}). Не было статистически значимых различий по уровню альбумина в крови между группами.

Не было статистически значимых различий по необходимости в ИВЛ или вазопрессорной поддержке между пациентами ММ на II и III стадиях (9,1% по сравнению с 7,9%; $p=0,3$).

Смертность от пневмонии за 30 дней составила 8,5% (умерли 4 больных ММ), при этом смертность у больных ММ на II стадии была 5,26% и 10,7% у больных ММ на III стадии.

Для определения наиболее значимых показателей гуморального, клеточного и неспецифического звеньев иммунитета при развитии инфекционных осложнений и оценки равномерности распределения исследуемых показателей применен дискриминантный анализ. Дискриминантный анализ проводился по методу Forward stepwise. Количество заданных шагов соответствовало количеству исследуемых параметров иммунного статуса. Установлено, что линейная дискриминантная функция состоит из 6 переменных (λ Уилкса=0,062, $p<0,005$). Величины и

статистическая достоверность Уилксовой и частичной λ представлены в табл. 15.

При использовании дискриминантного анализа из 40 вероятных маркеров инфекционных осложнений при ММ отобраны 6 наиболее информативных, которые в дальнейшем могут использоваться во врачебной практике. (табл.15).

Таблица 15

Величины и статистическая достоверность F-критерий Фишера для иммунологических параметров дискриминантной модели больных ММ с наличием инфекционных осложнений и без инфекционных осложнений

Показатели N=101	p-уровень	F-критерий Фишера
ИЛ-4 (пг/мл)– X1	0,027321	3,271142
CD4+, (абс) – X2	0,010175	4,117081
CD19+, (абс) – X3	0,040295	2,942521
ФНО-альфа (пг/мл)– X4	0,019587	3,554302
ИЛ-2(пг/мл) – X5	0,001563	5,776505
IgG(г/л) – X6	0,002297	5,429018

Наиболее значимыми параметрами дискриминантной модели являются содержание ИЛ-2, IgG, ИЛ-4, ФНО-альфа, абсолютное количество CD4⁺-клеток, абсолютное количество CD19⁺-клеток. Значения коэффициентов и константы линейных дискриминантных функций представлены в табл. 16.

Величины Уилксовой и частичной λ для иммунологических параметров дискриминантной модели больных ММ с наличием инфекционных осложнений и без инфекционных осложнений

Показатели N=101	Уилкс - λ	Частичная - λ
ИЛ-4 (пг/мл)– X1	0,073128	0,857391
CD4 ⁺ , абс – X2	0,075825	0,826895
CD19 ⁺ , абс – X3	0,072080	0,869853
ФНО-альфа (пг/мл)– X4	0,074031	0,846936
ИЛ-2(пг/мл) – X5	0,081115	0,772964
IgG(г/л) – X6	0,080007	0,783667

Полученное уравнение канонической величины для больных ММ с инфекционными осложнениями и без инфекционных осложнений имеет следующий вид:

$$F1 = -26,58 + 0,01 \times X1 + 0,19 \times X2 - 1,17 \times X3 + 0,15 \times X4 + 0,36 \times X5 - 0,03 \times X6,$$

$$F2 = -29,82 + 0,01 \times X1 + 0,26 \times X2 + 0,01 \times X3 + 0,15 \times X4 + 0,3 \times X5 - 0,025 \times X6,$$

$$F3 = -29,27 + 0,01 \times X1 + 0,27 \times X2 + 0,25 \times X3 + 0,19 \times X4 + 0,2 \times X5 + 0,08 \times X6,$$

$$F4 = -27,53 + 0,01 \times X1 + 0,23 \times X2 + 3,98 \times X3 + 0,08 \times X4 + 0,28 \times X5 + 0,09 \times X6, \text{ где}$$

X1-X6 – список наиболее информативных составляющих для дискриминации больных ММ с инфекционными осложнениями и без инфекционных осложнений (табл.15). Значения переменных X1-X6 стандартизированы. Больные ММ на II стадии будет относиться к группе с инфекционными осложнениями заболевания при $F2 > F1$, при $F1 > F2$ будет относиться к группе больных ММ на II стадии без инфекционных осложнений, соответственно больные ММ на III стадии будет относиться к группе с инфекционными осложнениями заболевания при $F4 > F3$, при $F3 > F4$ будет относиться к группе больных ММ на III стадии без инфекционных осложнений.

Расстояние Махаланобиса составило 5,01 ($p > 0,0001$), свидетельствующие о значимом различии между группами.

Точность диагностики в среднем имеет достоверность 89,1%.

Графическое распределение пациентов по каноническим величинам представлены на рис. 4, 5, 6, 7.

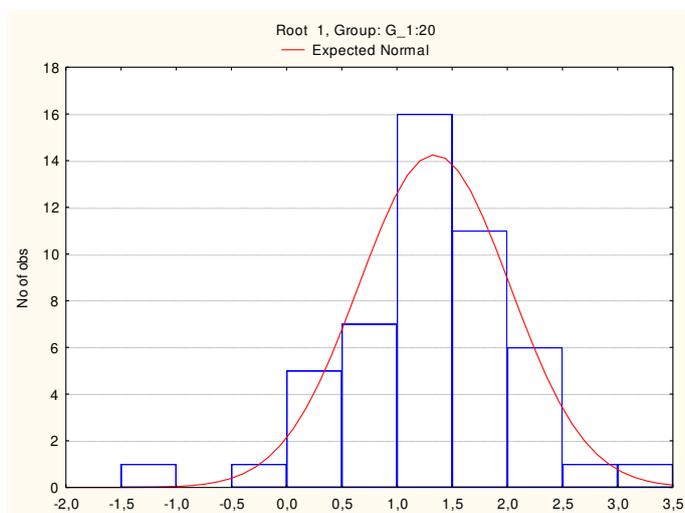


Рис. 4. Распределение больных ММ на II стадии без инфекционных осложнений по рассчитанной канонической переменной каждого больного

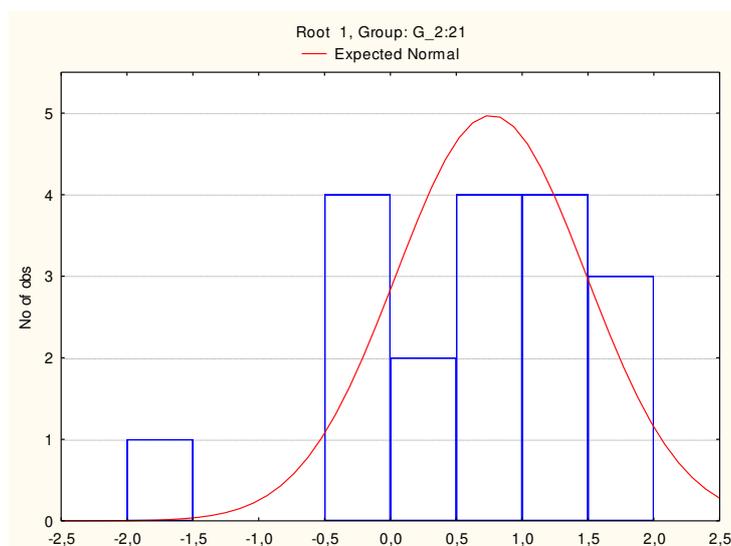


Рис. 5. Распределение больных ММ на II стадии с инфекционными осложнениями по рассчитанной канонической переменной каждого больного

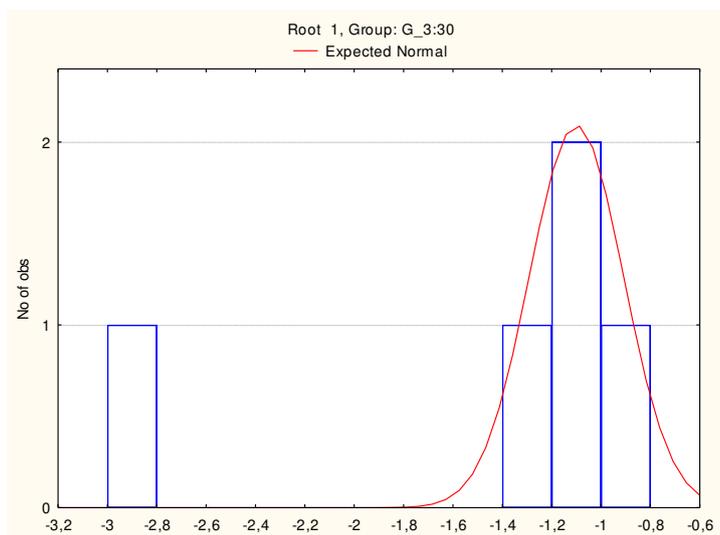


Рис. 6. Распределение больных ММ на III стадии без инфекционных осложнений по рассчитанной канонической переменной каждого больного

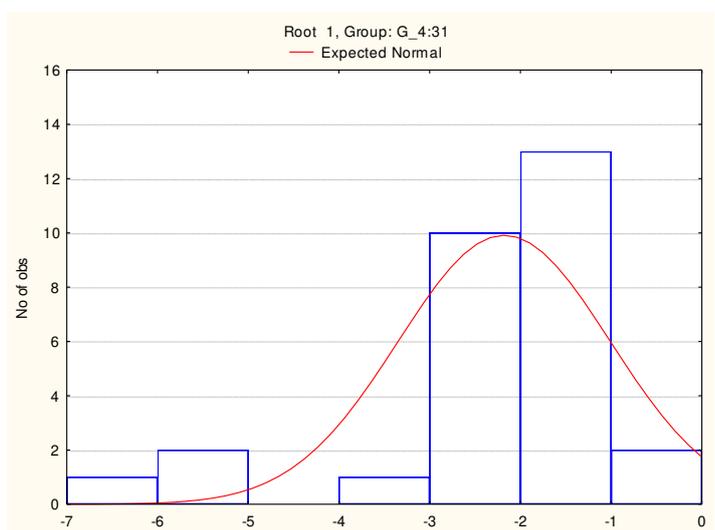


Рис. 7. Распределение больных ММ на III стадии с инфекционными осложнениями по рассчитанной канонической переменной каждого больного

Уровень значимости $F(48,244)=4,6378$ $p<0,00001$ позволяет делать вывод об адекватности построенной модели реальному процессу.

Выявленная совокупность 6 информативных показателей у больных ММ на разных стадиях заболевания с инфекционными осложнениями и без инфекционных поражений (концентрация ИЛ-4, ИЛ-2, IgG, ФНО-альфа, абсолютное количество $CD4^+$ - клеток, абсолютное количество $CD19^+$ - клеток) имеет практическую значимость, заключающуюся в том, что она может быть основой для разработки способа прогнозирования инфекционных

осложнений у больных ММ на разных стадиях заболевания, и является экономически выгодной.

Разработан способ прогнозирования развития инфекционных осложнений у больных множественной миеломой путем исследования крови, отличающийся тем, что в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяют уровни провоспалительных цитокинов — фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа) и интерлейкина-2 (ИЛ-2) и уровень противовоспалительного цитокина — интерлейкина-4 (ИЛ-4), и при уровне ФНО-альфа выше 0,5пг/мл, ИЛ-2 выше 10пг/мл и ИЛ-4 ниже 0,55пг/мл прогнозируют развитие инфекционных осложнений у больных ММ.

Данный способ апробирован на 100 больных ММ. Содержание цитокинов (ФНО-альфа, ИЛ-2, ИЛ-4) определяли иммуноферментным анализом. У 47 больных были спрогнозированы инфекционные осложнения, которые в дальнейшем подтверждались наблюдением. У 2 больных миеломной болезнью прогноз не совпал. По сочетанию уровней содержания цитокинов ФНО-альфа, ИЛ-2, ИЛ-4 было спрогнозировано развитие инфекционных осложнений, однако дополнительными методами исследования не подтвердились. Таким образом, отмечено совпадение прогноза в 98,0%.

Предложен новый способ прогнозирования инфекционных осложнений у больных ММ после химиотерапии (оформлена заявка на патент №2014124794 от 17.06.2014).

3.4. Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных множественной миеломой в зависимости от стадии заболевания

Нейтрофильные гранулоциты занимают одну из наиболее важных позиций в гуморально-клеточном иммунитете. С одной стороны, являясь

клетками первой линии неспецифической противомикробной защиты, активно участвуют в воспалении, являясь не только фагоцитами, но и эффекторами каскадных реакций и обеспечивающих развитие воспаления, обладают цитотоксическим действием на опухолевые клетки, способствуя противоопухолевой резистентности организма. Особенности функциональной активности НГ влияют на иммунологическую защиту организма в целом. В связи с этим, одной из задач нашей работы явилось изучение особенностей хемилюминесцентной активности НГ крови больных ММ G-варианта, в зависимости от стадии развития заболевания. Имеются данные о прямой зависимости хемилюминесценции и ФА НГ [3, 4].

Мы изучали люминол-зависимую хемилюминесценцию НГ, при которой оценивается суммарная активность всех кислородных и других радикалов. Анализ хемилюминесценции активности НГ, показал, что на всех стадиях заболевания у больных ММ, отмечается статистически значимое увеличение интенсивности спонтанной хемилюминесцентной активности НГ, приблизительно в 1,4 раза на III стадии относительно II стадии заболевания ($p < 0,001$) и в 3,65 раза при III стадии заболевания, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$).

Площадь кривой спонтанной хемилюминесцентной активности НГ у больных ММ статистически значимо увеличивалась в 14,59 раза на II стадии и в 10,64 раза на III стадии, относительно контрольной группы и II стадии заболевания ($p < 0,001$).

При этом не было достоверных изменений хемилюминесцентной активности НГ во времени выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции на II и III стадиях заболевания. Особенности спонтанной хемилюминесцентной активности НГ при ММ вероятно обусловлены наличием злокачественного онкологического заболевания и инфекционными осложнениями, которые регистрировались у больных.

После индукции хемилюминесцентного ответа опсонизированным зимозаном у больных ММ отмечалось статистически значимое увеличение

интенсивности индуцированной хемилюминесцентной активности НГ в 2,73 раз на II стадии заболевания, в 1,85 раз на III стадии заболевания относительно контрольной группы. При этом в сравнении со спонтанной хемилюминесценцией регистрировалось усиление «свечения» в 2,34 раз на II стадии заболевания, и в 1,13 раз на III стадии заболевания ($p < 0,001$).

Площадь кривой индуцированной хемилюминесценции у больных ММ статистически значимо увеличивалась в 18,01 раза на II стадии заболевания и в 12,5 раза на III стадии заболевания, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$). При этом в сравнении с площадью кривой спонтанной хемилюминесцентной активности НГ, площадь кривой индуцированной хемилюминесцентной активности НГ увеличивалась в 2,25 раз на II стадии заболевания и в 2,18 раз на III стадии заболевания (Табл.17).

Таблица 17

Показатели активности НГ у больных ММ в зависимости от стадии заболевания
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 1		Стадия II, N=65 2		Стадия III, N=35 3	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
Tmax спонтанная (сек.)	975,0	211,0-1510,0	943,0	564,0-1603,0	790,0	502,0-1374,0
I _{max} спонтанная (y.e.)	7720,0	3000,0-19000,0	20135,0	10088,0-52555,0	28213,0	18715,0-51385,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
Squr спонтанная(*10 ⁶)	0,22	0,15-0,54	3,21	1,15-6,19	2,34	0,14-2,71
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
Tmax индуцированная (сек.)	1102,5	872,0-1800,0	1164,0	765,0-1851,0	1023,0	866,0-1355,0
I _{max} индуцированная (y.e.)	17270,0	8000,0-42840,0	47203,0	31200,0-99928,0	31999	16542,0-102201,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	
Squr индуцированная (*10 ⁶)	0,4	0,15-0,95	7,24	1,39-10,6	5,01	0,11-8,09
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
Индекс активации	1,3	0,9-2,0	1,9	1,0-3,0	1,72	1,2-2,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/- с показателями больных на II стадии

Индекс активации, у больных ММ на II стадии заболевания статистически значимо увеличивался в 1,47 раза, и в 1,32 раза на III стадии заболевания относительно контрольной группы ($p < 0,001$), что свидетельствует о несбалансированной работе НГ.

Тем не менее, хемилюминесцентный анализ функциональной активности НГ, характеризующий уровень продукции первичных и вторичных АФК у больных ММ, не показал достоверного изменения времени выхода на максимум индуцированной хемилюминесцентной активности НГ, на II и III стадии заболевания относительно контроля.

С поражением почек показатели интенсивности спонтанной хемилюминесценции статистически значимо выше у больных ММ на IVB стадии заболевания в 2,51 раза относительно контрольной группы и IIA стадии заболевания ($p < 0,001$), на IIIB стадии заболевания показатели интенсивности спонтанной хемилюминесцентной активности НГ статистически значимо увеличивались в 3,64 раза относительно контрольной группы ($p < 0,001$) (Табл.12). При поражении почек у больных ММ площадь кривой спонтанной хемилюминесцентной активности НГ статистически значимо повышался в 13,68 раза у больных ММ на IVB стадии заболевания относительно контрольной группы, а на IIIB стадии заболевания статистически значимо повышался относительно контрольной группы и IIA стадии заболевания ($p < 0,001$). При этом не было достоверных изменений хемилюминесцентной активности НГ во времени выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции на стадиях с поражением почек. У больных ММ с поражением почек показатель интенсивности индуцированной хемилюминесцентной активности НГ статистически значимо повышался в 2,00 раза на IIB стадии заболевания по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$), а на IIIB стадии заболевания в 1,16 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$), и уменьшалась в 2,38 раза по сравнению с IIIA стадией заболевания ($p < 0,001$) (Табл. 18,19).

Таблица 18

Показатели активности НГ у больных ММ на II стадии с поражением почек и без
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=125 1		Стадия ПА, N=57 2		Стадия ПБ, N=8 3	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
Tmax спонтанная (сек.)	975,0	211,0-1510,0	880,0	552,0-1444,0	1635,0	956,0-2043,0
Imax спонтанная (y.e.)	7720,0	3000,0-19000,0	26594,0	11030,0-52555,0	19375,5	16271,0-20455,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
Squr спонтанная(*10 ⁶)	0,22	0,15-0,54	3,26	2,86-6,22	3,05	1,15-5,91
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
Tmax индуцированная (сек.)	1102,5	872-1800	1066,0	657,0-2122,0	1900,5	1715,0-9294,0
Imax индуцированная (y.e.)	17270	8000-42840	48032,0	32869,0-101554,0	34567,5	31215,0-37623,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001; p ₂ <0,001	
Squr индуцированная (*10 ⁶)	0,4	0,15-0,95	7,17	4,92-10,60	7,24	6,64-11,60
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
Индекс активации	1,3	0,9-2,0	1,75	1,0-4,0	2,24	2,0-6,0
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/- с показателями больных на ПА стадии

Таблица 19

Показатели активности НГ у больных ММ на III стадии с поражением почек и без
(Me, C₂₅-C₇₅, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=100 1		Стадия ША, N=27 2		Стадия ШБ, N=8 3	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
Tmax спонтанная (сек.)	975,0	211,0-1510,0	752,0	454,0-1571,0	894,0	454,0-1571,0
Imax спонтанная (y.e.)	7720,0	3000,0-19000,0	35347,0	5800,0-75166,0	28107,0	5800,0-75166,0
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
Squr спонтанная (*10 ⁶)	0,22	0,15-0,54	2,68	1,45-3,71	0,54	0,14-3,71
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001; p ₂ < 0,001	
Tmax индуцированная (сек.)	1102,5	872,0-1800,0	1023,0	867,0-1290,0	1093,5	867,0-1290,0
Imax индуцированная (y.e.)	17270,0	8000,0-42840,0	56321,0	1559,0-115409,0	20121,5	1559,0-115409,0
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001; p ₁ < 0,001	
Squr индуцированная (*10 ⁶)	0,4	0,15-0,95	5,44	0,11-8,19	1,07	0,11-8,19
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001; p ₂ < 0,001	
Индекс активации	1,3	0,9-2,0	1,81	1,3-2,0	1,51	1,3-2,0
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	

Примечание: p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂--/- с показателями больных на ШБ стадии

У больных ММ с поражением почек показатель площади кривой индуцированной хемилюминесцентной активности НГ статистически значимо повышался в 18 раз на ПВ стадии заболевания по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$) (Табл. 13,14). На ШВ стадии заболевания показатель площади кривой индуцированной хемилюминесцентной активности НГ статистически значимо увеличивался в 2,67 раз по сравнению с контрольной группой и статистически значимо уменьшался в 6,7 раз по сравнению с ША стадией заболевания ($p < 0,001$). Индекс активации у больных ММ с поражением почек статистически значимо повышается в 1,72 раза на ПВ стадии заболевания по сравнению с контрольной группой и в 1,16 раз на ШВ стадии заболевания по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, происходят следующие молекулярно-клеточные механизмы в хемилюминесценции НГ: на II стадии ММ статистически значимо повышались показатели хемилюминесцентной активности НГ, как при спонтанной, так и при индуцированной хемилюминесценции - интенсивность хемилюминесцентной активности НГ, площадь кривой, а также индекс активации, по сравнению с контрольной группой, и показатели при III стадии заболевания. Увеличенная индуцированная хемилюминесцентная активность НГ обусловлена активным участием фагоцитов в противоопухолевой защите организма.

На III стадии заболевания, выявляемые изменения хемилюминесцентной активности НГ были аналогичны - статистически значимо повышались показатели, как при спонтанной, так и при индуцированной хемилюминесценции - интенсивность хемилюминесценции, площадь кривой, а также индекс активации, по сравнению с контрольной группой.

При поражении почек на ПВ стадии заболевания статистически значимо повышались показатели хемилюминесцентной активности НГ, как при спонтанной, так и при индуцированной хемилюминесценции - интенсивность хемилюминесцентной активности НГ, площадь кривой, а

также индекс активации, по сравнению с контрольной группой и показателями на ПА стадии заболевания. На ШВ статистически значимо повышались показатели интенсивности спонтанной хемилюминесцентной активности НГ, площадь кривой хемилюминесценции, а также индекс активации, и статистически значимо снижались показатели площади спонтанной хемилюминесценции, интенсивности индуцированной хемилюминесцентной активности НГ и площади индуцированной хемилюминесцентной активности НГ по сравнению с ША стадией заболевания

При прогрессировании ММ на II стадии происходит увеличение индуцированной хемилюминесцентной активности НГ по сравнению с контрольной группой, что указывает на резервные возможности НГ.

Таким образом, у больных ММ происходят следующие молекулярно-клеточные изменения в хемилюминесценции НГ: на II стадии отмечается однонаправленные изменения хемилюминесцентной активности НГ, происходит увеличение спонтанной и индуцированной активности НГ. На III стадии ММ происходят разнонаправленные изменения в хемилюминесцентной активности НГ. При этом происходит снижение индуцированной и увеличение спонтанной хемилюминесцентной активности НГ по сравнению с больными на II стадии заболевания. При поражении почек отмечается резкое снижение индуцированной хемилюминесцентной активности НГ, что возможно обусловленное длительным воздействием опухоли на НГ и истощением их внутренних резервов.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Множественная миелома относится к В-лимфопролиферативным заболеваниям системы крови, встречающееся довольно часто. Каждый год в России регистрируется около 20000 новых случаев заболевания ММ. ММ до сих пор является неизлечимым заболеванием пожилого возраста. Частые рецидивы, инфекционные и вирусные осложнения, остеопороз, почечная недостаточность все это отягощают недолгую жизнь пациентов [133, 194]. Несмотря на эффективное лечение ММ почти все больные испытывают рецидив заболевания, а медиана выживаемости составляет 7-8 лет [142,210 162]. Общая продолжительность жизни от момента постановки диагноза и до гибели не превышает 8 лет, в среднем составляя 4,5 года. На первом месте среди причин смертности стоят инфекционные осложнения, которые даже при адекватной антибактериальной терапии не всегда приводят к выздоровлению. Для того, чтобы повысить выживаемость больных ММ требуется не только эффективная патогенетическая терапия, но и профилактика возникновения инфекционных осложнений на любой стадии заболевания.

Изучение ММ является одной из актуальных проблем современности, на сегодняшний день остается до конца непонятным как протекают молекулярно-клеточные механизмы в прогрессировании ММ [98, 112, 151, 187]. Несмотря на ряд проведенных исследований, многое в патогенезе ММ не изучено. До конца не определены взаимосвязи между злокачественной опухолью и особенностями реагирования иммунной системы. Отсутствуют исследования, в которых изучались комплексно особенности врожденного, адаптивного иммунитета, не проводилось одномоментное исследование неспецифического [60, 127], регуляторного, клеточного, гуморального звеньев иммунной системы в зависимости от стадий заболевания и наличия осложнений [136]. В связи с этим целью нашего исследования явилось установить молекулярные и клеточные механизмы прогрессирования и

иммунопатогенеза у больных ММ и разработать способ, позволяющий прогнозировать развитие инфекционных осложнений у больных множественной миеломой.

Для достижения поставленной цели было обследовано 101 больной диффузно-очаговой ММ G- иммунохимического варианта, в возрасте от 43 до 76 лет, средний возраст мужчин составлял – 60 лет \pm 2,3 года (от 47 до 73 лет), женщин – 61 год \pm 3,7 года (от 43 до 76 лет). Все больные были госпитализированы в гематологическое отделение краевой клинической больницы №1 г. Красноярск. Диагноз ММ верифицировали по результатам клинического и лабораторного исследований. Контрольная группа состояла из 125 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту. Обследование больных и практически здоровых людей проводилось с разрешения этического комитета ФГБУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, при этом каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование. В качестве рабочей классификации для определения стадий использовалась классификация по Durie, Salmon (1975 г.). В основе лежат критерии, разделяющие заболевание на три стадии в зависимости от уровня гемоглобина, уровня кальция, массы миеломных клеток и продукции М-компонента. Данные стадии субклассифицируют от наличия или отсутствия поражения почек по уровню креатинина в крови.

Проведенные нами методы исследований включали в себя:

1. Определение иммунного статуса методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺, HLA-DR.

2. Количественное определение иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG, IgE) иммуноферментным методом.

3. Количественное определение цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-4, ФНО-альфа, ИФН-альфа) иммуноферментным методом.

4. Хемилюминесцентный анализ активности нейтрофильных гранулоцитов.

5. Статистический метод исследования.

В ходе нашего исследования было выявлено, что большинство больных находились в возрастном диапазоне от 51 до 70 лет, при том количество женщин превалировало над количеством мужчин (62%). Возрастные данные соответствуют литературным описаниям и подтверждают, что ММ относится к болезням пожилого возраста. На II стадии заболевания ММ находилось 57 больных, при этом страдали поражениями почек – 8 человек. На III стадии находилось 27 больных ММ, из которых поражения почек отягощало заболевание у 8 больных (8,08%).

Мы выявили разнообразные молекулярные и клеточные аспекты в прогрессировании ММ.

В клеточном звене иммунитета на II стадии ММ мы выявили следующие молекулярно-клеточные изменения- наблюдается достоверное снижение относительного и абсолютного числа $CD3^+$ -клеток, достоверное увеличение относительного числа $CD4^+$ -клеток, достоверное увеличение относительного количества $CD8^+$ -клеток, абсолютного количества $CD16^+$ -клеток, относительного количества $CD19^+$ - клеток и статистически значимое снижения соотношения $CD4/CD8$. Наблюдается достоверное снижение зрелых Т-лимфоцитов, снижение $CD4^+$ - клеток, увеличение цитотоксических лимфоцитов, снижение NK клеток при повышении В-лимфоцитов, и снижение соотношения $CD4/CD8$ лимфоцитов за счет увеличения последних.

На III стадии наблюдается статистически значимое снижение относительного и абсолютного числа $CD3^+$ -клеток, статистически значимое увеличение относительного значения $CD8^+$ -клеток, абсолютного значения $CD16^+$ -клеток, относительного и абсолютного значения $CD19^+$ - клеток и статистически значимое снижение соотношения $CD4/CD8$.

При стадиях с поражением почек у больных регистрировались на II стадии следующие молекулярно-клеточные изменения - наблюдается

статистически значимое снижение относительного и абсолютного числа CD3⁺-клеток, статистически значимое увеличение относительного числа CD4⁺-клеток, статистически значимое увеличение относительного значения CD8⁺-клеток, абсолютного значения CD16⁺-клеток, относительного значения CD19⁺- клеток и статистически значимое снижение соотношения CD4/CD8.

На III стадии с поражением почек наблюдается статистически значимое снижение относительного и абсолютного числа CD3⁺-клеток, статистически значимое увеличение относительного значения CD8⁺-клеток, абсолютного значения CD16⁺-клеток, относительного и абсолютного значения CD19⁺-клеток и статистически значимое снижение соотношения CD4/CD8.

При изучении корреляционной зависимости между величиной IgG и особенностями клеточного звена иммунитета обнаружили зависимость средней силы положительную связь ($r=0,395$) между IgG и относительным содержанием CD19⁺-клеток при уровне достоверности $p < 0,001$. Обнаружили средней силы отрицательную связь ($r=-0,279$) между IgG и соотношением лейко-В-клеточным коэффициентом (лейкоциты/CD19⁺). Зарегистрировали зависимость средней силы отрицательную связь ($r=-0,359$) между IgG и соотношением CD4/CD8 при уровне достоверности $p < 0,001$. У больных ММ с поражением почек наблюдались аналогичные изменения. При иммунохимическом G-варианте ММ уровень содержания в крови IgG является патогномичным, поэтому мы изучали корреляционную зависимость особенностей клеточного звена иммунитета от уровня IgG.

На всех стадиях заболевания нами были установлены молекулярно-клеточные механизмы в прогрессировании ММ: достоверно снижается абсолютный уровень CD16⁺ клеток относительно контроля, что подтверждает уменьшение активности НК-клеток в противоопухолевом иммунитете при данном состоянии. Лейко-Т-клеточный показатель достоверно увеличивается на всех стадиях заболевания, а индекс активации Т-лимфоцитов достоверно снижается также на всех стадиях ММ относительно контроля, что еще раз подтверждает развитие Т-клеточного

иммунодефицита, обусловленного снижением CD3⁺-клеток у больных. Лейко-В-клеточный показатель наоборот достоверно снижается на всех стадиях ММ относительно контроля, особенно значительно на III стадии заболевания, что свидетельствует об активации В-клеточного звена иммунитета при прогрессировании процесса. Проводя комплексные исследования мы выявили разнообразные молекулярно-клеточные аспекты в прогрессировании ММ. У больных ММ наблюдается Т, В-клеточное угнетение. Наиболее значимыми факторами при ММ является снижение зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), CD4⁺- клеток, NK клеток при повышении В-лимфоцитов, снижение соотношения CD4/CD8 лимфоцитов за счет увеличения последних и увеличение цитотоксических лимфоцитов.

При изучении гуморального звена иммунитета выявили следующие молекулярно-клеточные изменения в соотношении продуцируемых иммуноглобулинов. По мере прогрессирования заболевания у больных наблюдаются изменения в продуцировании иммуноглобулинов основных классов относительно контрольного диапазона, что в свою очередь подтверждает нарушение гуморального звена иммунитета при ММ и может приводить к прогрессированию заболевания. Увеличение сывороточной концентрации IgG на всех стадиях заболевания независимо от степени поражения почек относительно контроля, является диагностическим критерием ММ – G иммунохимического варианта. Наиболее значимыми факторами в прогрессировании ММ на II стадии заболевания ММ регистрировались статистически значимые изменения иммуноглобулинов - увеличивались концентрации IgG, уровня относительного синтеза IgG/CD19⁺, и статистически значимо уменьшались концентрации IgE и соотношение IgA/CD19⁺, IgE/CD19⁺. На III стадии заболевания ММ регистрировались статистически значимые изменения иммуноглобулинов - увеличивались концентрации IgG, уровня относительного синтеза IgG/CD19⁺, и статистически значимо уменьшались концентрации IgE и соотношение IgA/CD19⁺, IgE/CD19⁺. При стадиях с поражением почек

наблюдается аналогичная ситуация. На II стадии заболевания регистрируются статистически значимые повышения концентрации IgG, уровней относительного синтеза IgG/CD19⁺. Выявлено статистически значимое снижение IgE, уровней относительного синтеза IgA/CD19⁺, IgE/CD19⁺, IgE/CD19⁺. На III стадии регистрировалось статистически значимое повышение синтеза IgG и уровней относительного синтеза IgG/CD19⁺. Выявлено статистически значимое снижение IgE, уровней относительного синтеза IgA/CD19⁺, IgE/CD19⁺, IgE/CD19⁺.

При изучении корреляционной зависимости между величиной IgG и результатами гуморального иммунитета обнаружили сильной силы положительную связь ($r=0,73$) между IgG и IgG/CD19⁺, при уровне достоверности $p<0,001$.

Выявленные нами молекулярно-клеточные механизмы в прогрессировании ММ по изменениям клеточного и гуморального звеньев иммунитета представлены на рис. 8.

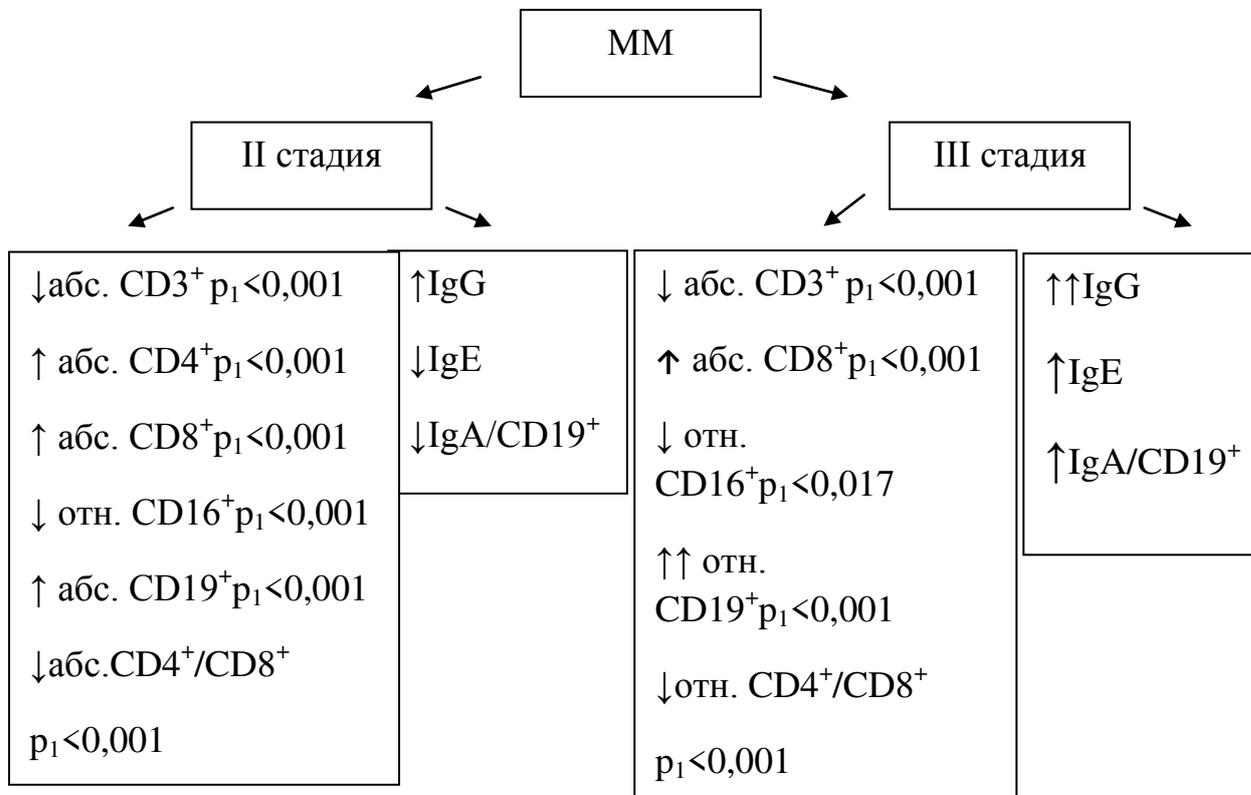


Рис.8 Особенности клеточного и гуморального звеньев иммунитета при множественной миеломе

У больных на II стадии ММ уровни цитокинов ИЛ-2, ИЛ-8, были статистически значимо выше, а уровень ИЛ-4 ниже по сравнению с контрольной группой. В группе больных на III стадии ММ уровни ИЛ-2, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма-интерферона были статистически значимо выше по сравнению с контролем, а уровень ИЛ-4 статистически значимо ниже.

При повреждении почек у больных ММ наблюдаются значительные молекулярно-клеточные изменения в содержании цитокинов. При IIВ стадии ММ статистически значимо увеличиваются уровни ФНО-альфа, ИЛ-2 и гамма-интерферона, и статистически значимо уменьшается уровень ИЛ-4. При IIIВ стадии аналогично увеличиваются значения цитокинов ФНО-альфа, ИЛ-2, ИЛ-8 и гамма-интерферона, и статистически значимо уменьшается значения ИЛ-4.

При изучении корреляционной зависимости между величиной IgG и особенностями содержания цитокинов при ММ выявили средней силы положительную связь между IgG и ФНО-альфа ($r=0,420$) при $p<0,001$, средней силы положительную связь между IgG и ИЛ-8 ($r=0,444$) при $p<0,001$. Выявили средней силы положительную связь между IgG и ИЛ-2 ($r=0,459$) при $p<0,001$. Выявили средней силы положительную связь между IgG и интерферон-альфа ($r=0,420$) при $p<0,001$. А так же зарегистрировали отрицательную средней силы связь между IgG и ИЛ-4 ($r=-0,498$) при $p<0,001$.

При использовании дискриминантного анализа из 40 вероятных маркеров инфекционных осложнений при ММ отобраны 6 наиболее информативных, которые в дальнейшем могут использоваться во врачебной практике. Выявлен F-критерий Фишера $F=117,117$, $\text{при } p=2,3083$. Наиболее значимыми параметрами дискриминантной модели являются содержание ИЛ-2, содержание IgG, Ил-4, абсолютный уровень CD4+-клеток, абсолютный уровень CD19+-клеток, концентрация ФНО-альфа. Наиболее информативными значениями являются содержание ИЛ-2, IgG, абсолютный уровень CD4+-клеток, ИЛ-4, ФНО-альфа и абсолютный уровень CD19+-клеток. Полученное уравнение канонической величины для больных

ММ с инфекционными осложнениями и без инфекционных осложнений имеет следующий вид:

$$F1 = -26,58 + 0,01 \times X1 + 0,19 \times X2 - 1,17 \times X3 + 0,15 \times X4 + 0,36 \times X5 - 0,03 \times X6,$$

$$F2 = -29,82 + 0,01 \times X1 + 0,26 \times X2 + 0,01 \times X3 + 0,15 \times X4 + 0,3 \times X5 - 0,025 \times X6,$$

$$F3 = -29,27 + 0,01 \times X1 + 0,27 \times X2 + 0,25 \times X3 + 0,19 \times X4 + 0,2 \times X5 + 0,08 \times X6,$$

$$F4 = -27,53 + 0,01 \times X1 + 0,23 \times X2 + 3,98 \times X3 + 0,08 \times X4 + 0,28 \times X5 + 0,09 \times X6,$$
 где

$X1-X6$ – список наиболее информативных составляющих для дискриминации больных ММ с инфекционными осложнениями и без инфекционных осложнений (Табд.15). Значения переменных $X1-X6$ стандартизованы. Больные ММ на II стадии будет относиться к группе с инфекционными осложнениями заболевания при $F2 > F1$, при $F1 > F2$ будет относиться к группе больных ММ на II стадии без инфекционных осложнений, соответственно больные ММ на III стадии будет относиться к группе с инфекционными осложнениями заболевания при $F4 > F3$, при $F3 > F4$ будет относиться к группе больных ММ на III стадии без инфекционных осложнений.

Расстояние Махаланобиса составило 5,01 ($p > 0,0001$), свидетельствующие о значимом различии между группами.

Точность диагностики в среднем имеет достоверность 89,1%.

Уровень значимости $F(48,244) = 4,6378$ $p < 0,00001$ позволяет делать вывод об адекватности построенной модели реальному процессу.

Предложена новый способ, позволяющий прогнозировать инфекционные осложнения у больных ММ (оформлена заявка на патент №2014124794 от 17.06.2014).

Способ осуществляется следующим образом:

У больного с диагнозом ММ, независимо от стадии заболевания, забирают венозную кровь из локтевой вены свободным током в пробирку. Из образца выделяют сыворотку. Метод определения основан на «сэндвич» варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител к цитокинам ФНО-альфа, ИЛ-2 и ИЛ-4 с использованием коммерческих тест-систем «Вектор-Бест». При сочетании

содержания цитокинов: ФНО-альфа выше 0,5пг/мл, ИЛ-2 выше 10пг/мл и ИЛ-4 ниже 0,55пг/мл прогнозируют развитие инфекционных осложнений у больных ММ.

Клинический пример 1. Больная В., 63 года, поступила на стационарное лечение в гематологическое отделение ККБ №1 г. Красноярска с диагнозом: ММ, G-вариант, диффузно-очаговая форма, II стадия. Больная поступила на очередной курс химиотерапии. При поступлении состояние больной средней степени тяжести, беспокоит сильная слабость, боли в костях.

Проведено обследование по заявленному способу. Определены уровни цитокинов в сыворотке крови:

ФНО-альфа	1 пг/мл (выше 0,5 пг/мл)
ИЛ-2	13 пг/мл (выше 10 пг/мл)
ИЛ-4	0,4 пг/мл (ниже 0,55 пг/мл)

У больной прогнозируют развитие инфекционных осложнений.

В течение недели у больной нарастала слабость, появились кашель, боли в грудной клетке, рентгенологически диагностирована правосторонняя долевая пневмония. Больной назначена антибактериальная терапия.

Клинический пример 2. Больной О, 59 лет, поступил на стационарное лечение в гематологическое отделение ККБ №1 г. Красноярска с диагнозом: ММ, G-вариант, диффузно-очаговая форма, III стадия. При поступлении состояние больного средней степени тяжести, беспокоит выраженная слабость, повышенная утомляемость, боли в костях.

Проведено обследование по заявленному способу. Определены уровни цитокинов в сыворотке крови:

ФНО-альфа	0,3 пг/мл (ниже 0,5 пг/мл)
ИЛ-2	8 пг/мл (ниже 10 пг/мл)
ИЛ-4	1 пг/мл (выше 0,55 пг/мл)

Уровни содержания цитокинов изменены, но не достигают пороговых значений, у больного не прогнозируют развитие инфекционных осложнений.

Больному назначен курс плановой химиотерапии. Инфекционных осложнений у больного зарегистрировано не было.

Данный способ апробирован на 100 больных ММ (у 65 больных II стадия, у 35 – III стадия заболевания), проходивших лечение в гематологическом отделении Краевой клинической больницы №1 г.Красноярска. Содержание цитокинов (ФНО-альфа, ИЛ-2, ИЛ-4) определяли иммуноферментным анализом. У 47 больных были спрогнозированы инфекционные осложнения, которые в дальнейшем подтверждались наблюдением. У 2 больных ММ прогноз не совпал. По сочетанию уровней содержания цитокинов ФНО-альфа, ИЛ-2, ИЛ-4 было спрогнозировано развитие инфекционных осложнений, однако дополнительными методами исследования не подтвердились. Таким образом, отмечено совпадение прогноза в 98,0%.

Технический результат от реализации предлагаемого способа:

- повышение точности прогнозирования инфекционных осложнений у больных миеломной болезнью за счет анализа регуляторного звена иммунной системы;
- сокращение длительности исследования;
- возможность ранней диагностики инфекционных осложнений при миеломной болезни;
- расширение арсенала средств для прогнозирования инфекционных осложнений у больных миеломной болезнью.

Таким образом, предложенный высокочувствительный информативный способ позволяет своевременно диагностировать прогрессирование заболевания, появление осложнений, корректировать план и тактику лечения данной категории больных и улучшить результаты их реабилитации.

Способ прогнозирования инфекционных осложнений у больных ММ путем исследования крови, отличающийся тем, что в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяют уровни провоспалительных цитокинов — фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-

альфа) и интерлейкина-2 (ИЛ-2) и уровень противовоспалительного цитокина — интерлейкина-4 (ИЛ-4), и при уровне ФНО-альфа выше 0,5пг/мл, ИЛ-2 выше 10пг/мл и ИЛ-4 ниже 0,55пг/мл прогнозируют развитие инфекционных осложнений у больных миеломной болезнью.

Выявленные нами молекулярно-клеточные механизмы в прогрессировании ММ по особенностям содержания цитокинов представлены на рис. 9.

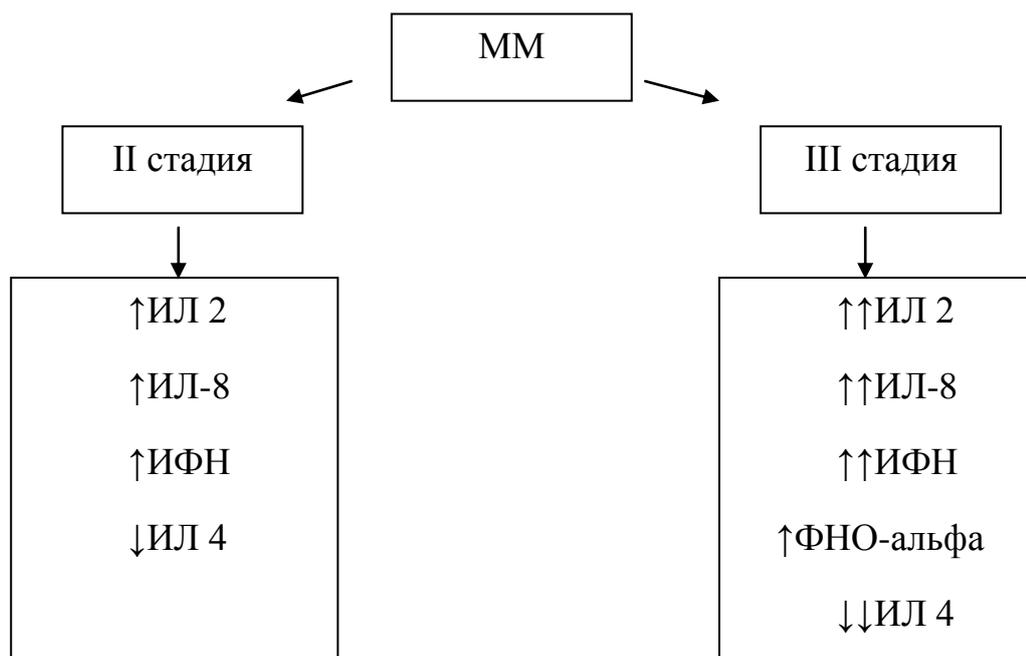


Рис. 9 Особенности содержания цитокинов при множественной миеломе в зависимости от стадии заболевания

При исследовании хемилюминесцентной активности НГ выявили, что развитие опухоли в организме больных ММ сопровождается последовательным изменением функциональной активности НГ.

Таким образом, у больных ММ происходят следующие молекулярно-клеточные изменения в хемилюминесценции НГ: на II стадии отмечается однонаправленные изменения хемилюминесцентной активности НГ, происходит увеличение спонтанной и индуцированной активности НГ. На III стадии ММ происходят разнонаправленные изменения в хемилюминесцентной активности НГ. При этом происходит снижение индуцированной и увеличение спонтанной хемилюминесцентной активности

НГ по сравнению с больными на II стадии заболевания. При поражении почек отмечается резкое снижение индуцированной хемилюминесцентной активности НГ, что возможно обусловленное длительным воздействием опухоли на НГ и истощением их внутренних резервов.

При поражении почек на IIВ стадии заболевания статистически значимо повышались показатели хемилюминесцентной активности НГ, как при спонтанной, так и при индуцированной хемилюминесцентной активности НГ - интенсивность хемилюминесценции, площадь кривой, а также индекс активации, по сравнению с контрольной группой и показателями на IIА стадии заболевания. На IIВ статистически значимо повышались показатели интенсивности спонтанной хемилюминесцентной активности НГ, площадь кривой хемилюминесценции, а также индекс активации, и статистически значимо снижались показатели площади спонтанной хемилюминесценции, интенсивности индуцированной хемилюминесценции и площади индуцированной хемилюминесценции по сравнению с IIА стадией заболевания

Увеличение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции НГ при поражении почек у больных ММ так же наблюдается увеличение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции НГ, но показатели активации НГ ниже, чем у больных ММ без поражения почек. Увеличение спонтанной хемилюминесцентной активности НГ при снижении индуцированной хемилюминесцентной активности НГ.

При поражении почек регистрируется резкое снижение индуцированной хемилюминесцентной активности НГ, возможно обусловленное длительным воздействием опухоли на НГ и истощением их внутренних резервов.

Выявленные нами молекулярно-клеточные механизмы в прогрессировании ММ по особенностям хемилюминесцентной активности представлены на рис. 10.

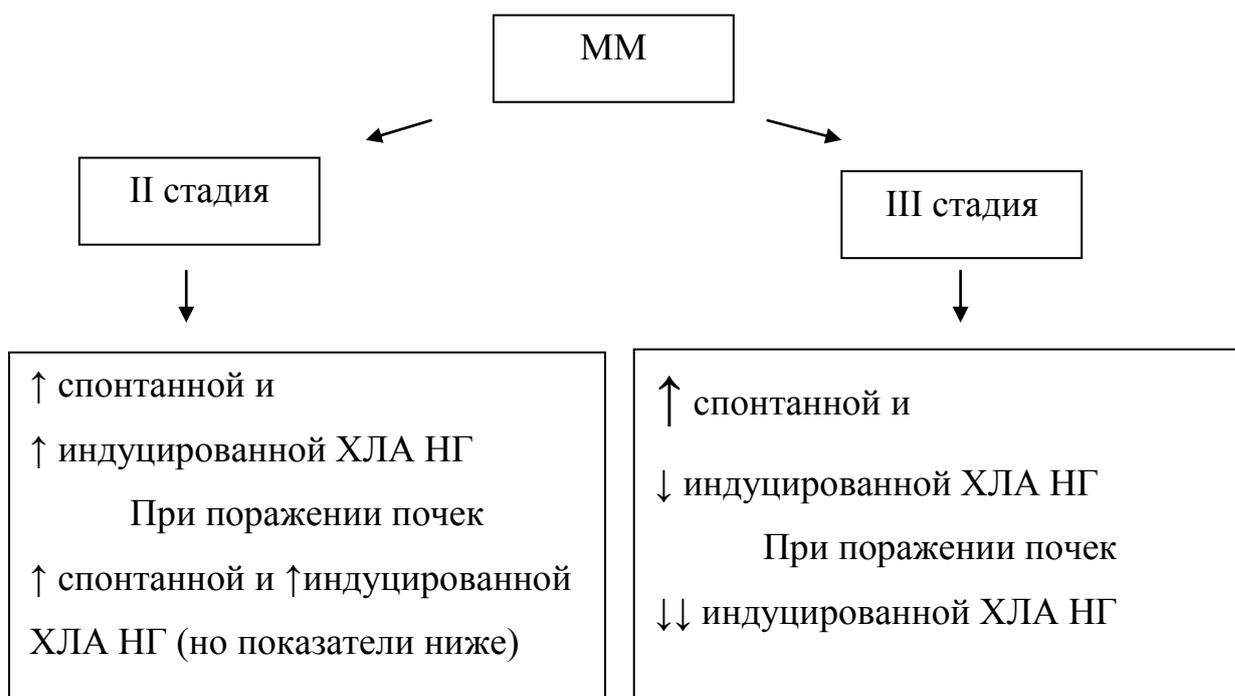
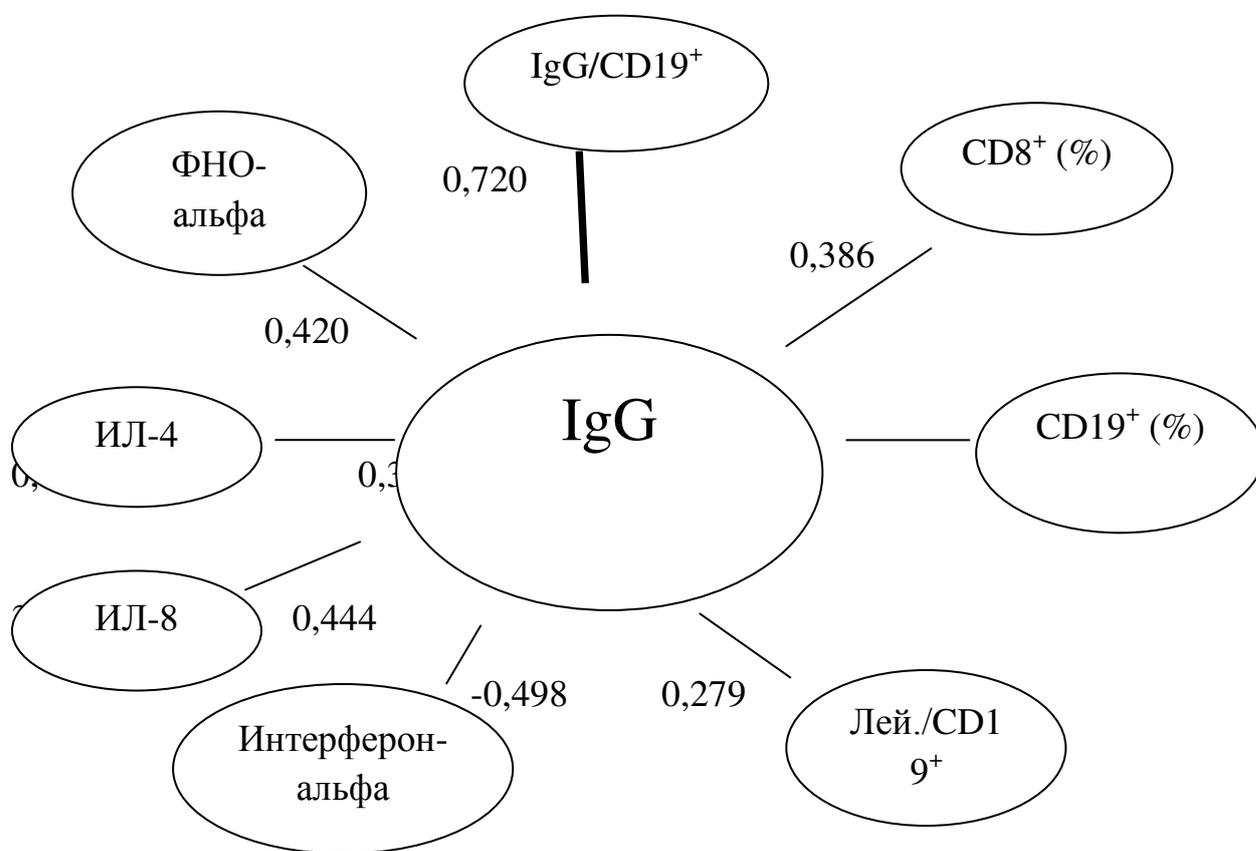


Рис. 10 Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов при множественной миеломе

В патогенезе ММ G-иммунохимического варианта играет основную роль IgG. Так как увеличенное содержание IgG являлось патогномичным при данном виде заболевания мы изучили взаимосвязи содержания IgG с показателями клеточного, гуморального, неспецифического и цитокинового звеньев иммунитета. Выявили, что наибольшую положительную корреляционную связь ($r=0,72$) имеет зависимость между величиной IgG и IgG/CD19+, при уровне достоверности $p<0,001$. Обнаружили средней силы положительную связь ($r=0,386$) между IgG и относительным количеством CD8+, при уровне достоверности $p<0,001$. Зарегистрировали зависимость средней силы положительную связь ($r=0,395$) между IgG и относительным содержанием CD19+-клеток при уровне достоверности $p<0,001$. Обнаружили средней силы отрицательную связь ($r=-0,279$) между IgG и соотношением лейко-В-клеточным коэффициентом (лейкоциты/CD19+), при уровне достоверности $p<0,001$, Зарегистрировали зависимость средней силы отрицательную связь ($r=-0,359$) между IgG и соотношением CD4/CD8 при уровне достоверности $p<0,001$.

При изучении корреляционной зависимости между величиной IgG и особенностями содержания цитокинов при ММ выявили средней силы положительную связь между IgG и ФНО-альфа ($r=0,420$) при $p<0,001$, средней силы положительную связь между IgG и ИЛ-8 ($r=0,444$) при $p<0,001$. Выявили средней силы положительную связь между IgG и ИЛ-2 ($r=0,459$) при $p<0,001$. Выявили средней силы положительную связь между IgG и интерферон-альфа ($r=0,420$) при $p<0,001$. А так же зарегистрировали отрицательную средней силы связь между IgG и ИЛ-4 ($r=-0,498$) при $p<0,001$ (Рис.11).



~~$r \geq 0,75$~~ связь сильная

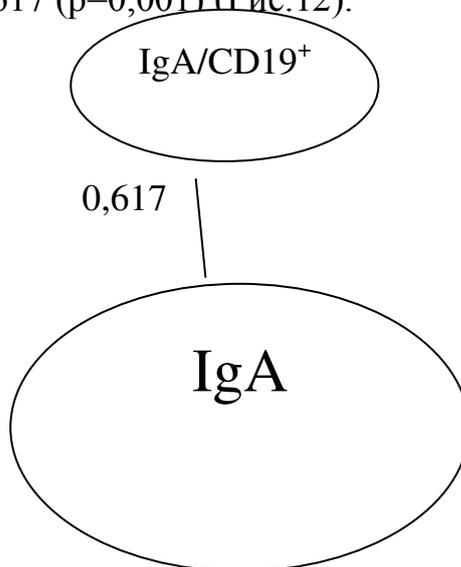
$0,25 < r < 0,75$ – средняя связь

Рис. 11 Корреляционные взаимодействия IgG с показателями клеточного, гуморального, неспецифического и цитокинового звеньев иммунитета

Таким образом, наиболее значимыми молекулярно-клеточными факторами при прогрессировании ММ являются G-иммунохимического

варианта является соотношение IgG/ CD19⁺ - клеткам, уровни ИЛ-8, ИЛ-4, ФНО-альфа, интерферон-альфа, CD8⁺-клеток, CD19⁺-клеток, соотношения лейкоциты/CD19⁺- клеткам.

Множественная миелома – заболевание, сопровождающееся злокачественной пролиферацией плазматических клеток, накоплением моноклональных патологических иммуноглобулинов. ММ – В-лимфопролиферативный гемобластоз низкой степени злокачественности. Следовательно, при прогрессировании заболевания изменения в гуморальном звене иммунитета, в соотношении нормальных продуцируемых иммуноглобулинов будет иметь патогенетическое значение. Поэтому мы изучили корреляционные взаимодействия иммуноглобулинов при ММ с показателями клеточного, гуморального, неспецифического и цитокинового звеньев иммунитета. Проанализированы корреляционные взаимодействия IgA с показателями клеточного, гуморального, неспецифического и цитокинового звеньев иммунитета. Выявлено, что наблюдается положительная средней силы корреляционная связь между соотношением IgA/CD19 и IgA, при $r=0,617$ ($p=0,001$) (Рис.12).



$0,25 < r < 0,75$ – средняя связь

Рис. 12 Корреляционные взаимодействия IgA с показателями клеточного, гуморального, неспецифического и цитокинового звеньев иммунитета

Таким образом, наиболее значимыми молекулярно-клеточными факторами при ММ являются соотношение IgA/CD19, уровень интенсивности индуцированной хемилюминесценции НГ, уровень ФНО - альфа.

Проанализированы корреляционные взаимодействия IgE с показателями клеточного, гуморального, неспецифического и цитокинового звеньев иммунитета. Выявлено, что наблюдается положительная сильной силы корреляционная связь между соотношением IgE/CD19 и IgE, при $r=0,787$ ($p=0,001$), а также положительная средней силы корреляционная взаимосвязь между ИЛ-4 и IgA, при $r=0,309$ ($p=0,001$) (Рис.13).

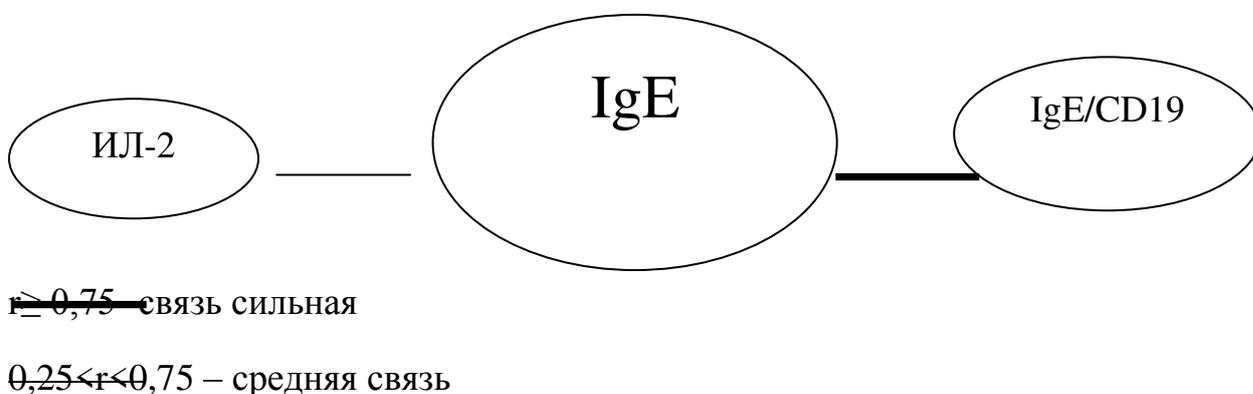
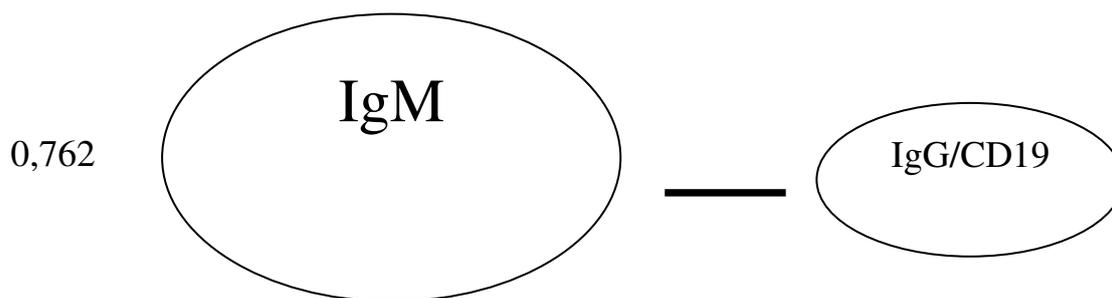


Рис. 13 Корреляционные взаимодействия IgE с показателями клеточного, гуморального, неспецифического и цитокинового звеньев иммунитета

Таким образом, наиболее значимыми молекулярно-клеточными факторами при ММ являются соотношение IgE/CD19 и уровень ИЛ-4.

Проанализированы корреляционные взаимодействия IgM с показателями клеточного, гуморального, неспецифического и цитокинового звеньев иммунитета. Выявлено, что наблюдается положительная сильной силы корреляционная связь между соотношением IgM/CD19 и IgE, при $r=0,762$ ($p=0,001$) (Рис.14).



~~$r \geq 0,75$~~ - связь сильная

Рис. 14 Корреляционные взаимодействия IgM с показателями клеточного, гуморального, неспецифического и цитокинового звеньев иммунитета

Таким образом, наиболее значимыми молекулярно-клеточными факторами при MM являются соотношения IgM/CD19, IgA/CD19⁺ и лей./CD19⁺.

Таким образом, проведенный корреляционный анализ позволил выявить наиболее значительные молекулярно-клеточные факторы в прогрессировании MM: уровень содержания ФНО-альфа, интенсивность индуцированной хемилюминесценции НГ и уровни относительного синтеза иммуноглобулинов.

В целом, по результатам нашего исследования мы определили наиболее важные молекулярно-клеточные механизмы прогрессирования MM (рис.15):

1. Нарушение врожденного иммунитета – снижение активности НГ и НК-клеток.
2. Развивающийся вторичный комбинированный Т-В – клеточный иммунодефицит.
3. Преобладание провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-8, ФНО-альфа, гамма-интерферон) над противовоспалительными (ИЛ-4).
4. Девияция клеточного иммунного ответа по Th-1 – типу.

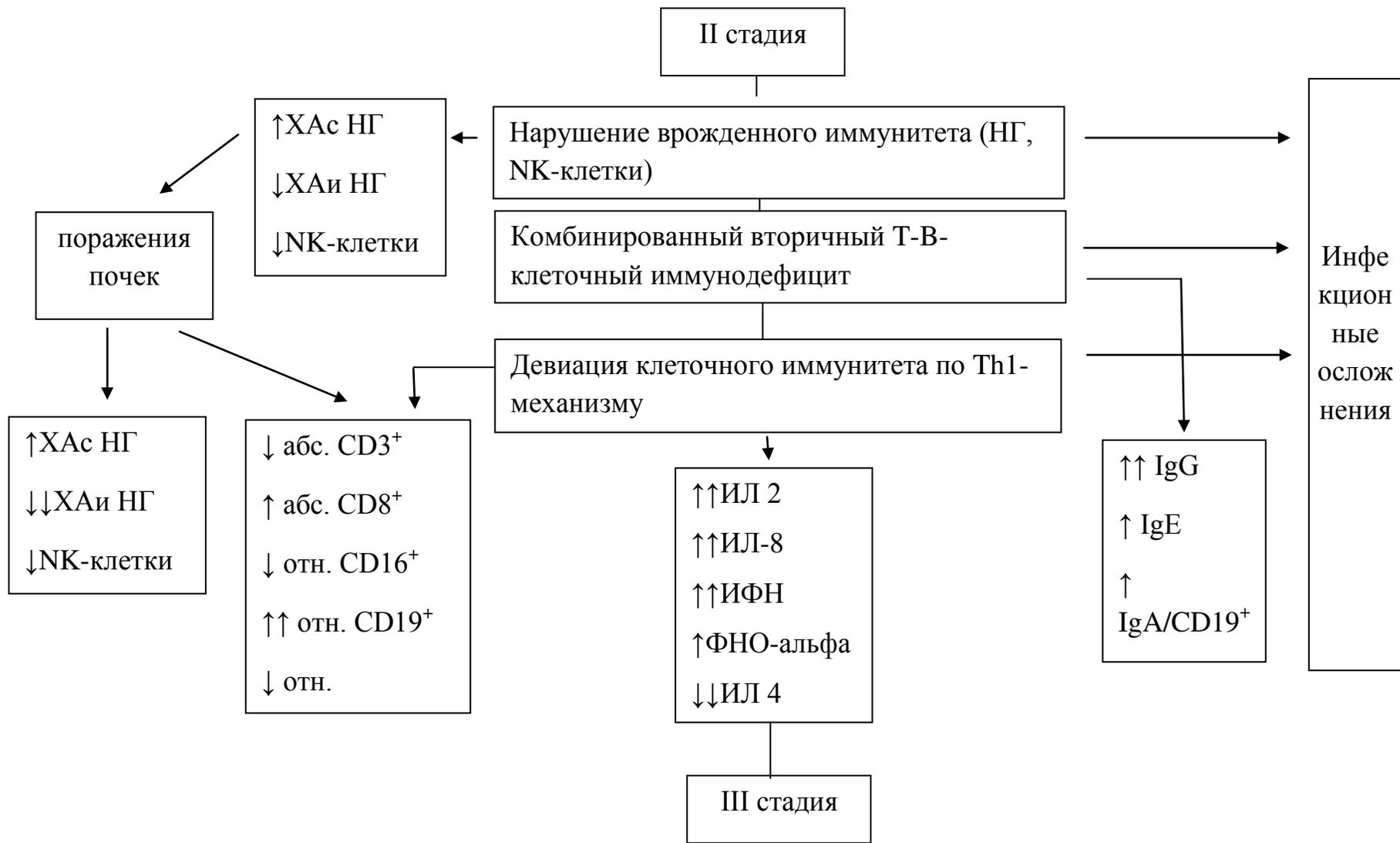


Рис. 15 Молекулярно-клеточные механизмы прогрессирования множественной миеломы

ВЫВОДЫ

1. У больных множественной миеломой развивается комбинированный, вторичный Т,В – клеточный иммунодефицит. По мере прогрессирования заболевания снижается уровень $CD4^+$ -клеток к цитотоксическим лимфоцитам (0,85 [0,56-1,14] против 0,61 [0,41-1,26], $p_{u-m}=0,001$). Нарастают признаки недостаточности В-лимфоцитарного звена (0,75 [0,27-0,78] против 0,48 [0,33-0,73], $p_{u-m}=0,001$). Уровень НК-клеток снижается на всех стадиях заболевания (0,27 [0,17-0,49] и 0,25 [0,13-0,58] против 0,38 [0,26-0,85], $p_{u-m}=0,001$).

2. При множественной миеломе наблюдаются нарушения в гуморальном звене иммунитета, характеризующиеся изменениями концентраций иммуноглобулинов. Увеличение сывороточной концентрации IgG на всех стадиях болезни относительно контроля является идентифицирующей и подтверждает диагноз множественной миеломы-G иммунохимического варианта (24,5 [6,0-26,0] и 72,0 [58,0-109,0] против 10 [8,0-14,0], $p_{u-m}=0,001$).

3. Развитие множественной миеломы сопровождается изменением функциональных свойств периферических нейтрофильных гранулоцитов, зависящее от стадии заболевания и поражения почек. На II стадии заболевания имеется однонаправленное увеличение спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности НГ (20135,0 [10088,0-52555,0] и 47203,0 [31200,0-99928,0] против 7720,0 [3000,0-19000,0] и 17270,0 [8000,0-42840,0], $p_{u-m}=0,001$) на III стадии – увеличение спонтанной при снижении индуцированной хемилюминесцентной активности НГ (28213,0 [18715,0-51385,0] и 31999 [16542,0-102201,0] против 20135,0 [10088,0-52555,0] и 47203,0 [31200,0-99928,0], $p_{u-m}=0,001$). При поражении почек – показатели активности нейтрофильных гранулоцитов снижены, особенно индуцированной на IIIВ стадии ($p<0,001$).

4. При множественной миеломе наблюдается дисбаланс провоспалительных ИЛ-2 (8,0 [6,0-13,0] и 10,0 [7,0-15,0] против 1,1 [0,5-3,05], $p_{u-m}=0,001$), ИЛ-8 (3,0 [2,0-4,0] и 6,0 [3,0-20,0] против 2,1 [0,5-4,0], $p_{u-m}=0,001$), ФНО-альфа (0,45 [0,4-3,0] и 1,0 [0,4-4,0] против 0,54 [0,38-0,87], $p_{u-m}=0,001$), гамма-интерферон (4,0 [3,0-15,0] и 7,0 [6,0-15,0] против 0,6 [0,22-4,0], $p_{u-m}=0,001$) и противовоспалительных ИЛ-4 (1,0 [0,5-2,0] и 0,6 [0,2-1,0] против 7,0 [5,6-7,8], $p_{u-m}=0,001$) цитокинов, с преобладанием провоспалительных. Имеется девиация клеточного иммунного ответа по Th1-типу.

5. В ходе дискриминантного анализа были определены наиболее информативные показатели у больных ММ с инфекционными осложнениями: содержание ИЛ-2, IgG, ИЛ-4, ФНО-альфа, абсолютные количества CD4⁺-клеток, CD19⁺-клеток. (% правильной классификации – 82%). Уровень значимости $F(48,244) = 4,6378$ $p < 0,00001$ позволяет делать вывод об адекватности построенной модели реальному процессу.

6. Разработан способ прогнозирования инфекционных осложнений у больных множественной миеломой: при сочетании уровней содержания цитокинов: ФНО-альфа выше 0,5 пг/мл, ИЛ-2 выше 10 пг/мл, ИЛ-4 ниже 0,55 пг/мл прогнозируется развитие инфекционных осложнений у больных множественной миеломой, специфичность данного метода составила 100%, а чувствительность 98% (заявка на патент №2014124794).

Список литературы

1. Абакумова, Т.В. Неспецифический клеточный иммунитет на разных стадиях рака шейки матки / Т.В. Абакумова, И.И.Антонеева // Ульяновский медико-биологический журнал. -2012.-№2. -С. 104-110.
2. Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С.С., Стельмашенко Л.В. и др. // Вопр. онкол. — 1997. — Т. 3. — С. 341—346.
3. Агилова, Ю.Н. Роль цитокинов в прогрессировании миеломной болезни // Ю.Н. Агилова, О.В. Смирнова, В.Т. Манчук // Врач-аспирант. - 2014. Т. 62, № 1.3. -С. 404-407.
4. Андреева Н.Е, Балакирева Т.В. Парапρωтеинемические гемобластозы // Руководство по гематологии / под ред. А. И. Воробьева. – 3-е изд., перераб. и доп. – М., 2003. – Т. 2. – С. 151–184.
5. Антипова, Л.Г. Высокая продолжительность жизни при миеломной болезни / Л.Г. Антипова, Н.Е. Андреева // Тер. Арх. -1985. №7: -С.7–14.
6. Афоина, Г.Б. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа / Г.Б. Афоина, В.Г. Майданник // Врачеб. дело. -1990. №9. - С.73-78.
7. Бабкина, И.В. Цитокины в сыворотке крови больных первичными опухолями костей / И.В. Бабкина, И.Н. Кузнецов, Е.Ю. Руссо, Л.Т. Лякина, В.Г. Дегтярь // Технологии живых систем. -2013. Т. 10, № 3. -С. 21-35.
8. Бажанов, С.П. Оценка показателей клеточного иммунитета на фоне комплексного лечения у больных со злокачественными опухолями уровня краниовертебрального перехода и верхнего отдела позвоночника / С.П. Бажанов, В.Ю. Ульянов, И.А. Норкин, В.В. Щуковский, Д.А. Гуляев // Фундаментальные исследования. -2013.-№3-2. -С. 250-254.
9. Бакулина, Е.С. Характеристика иммунных нарушений у больных множественной миеломой / Е.С. Бакулина, Ю.В. Шатохин, И.В. Снежко, О.Н. Шатохина, Е.А. Гранкина // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. -2011, № 5. -С. 87-89.

10. Баранов, А.П. Миеломная болезнь с острой почечной недостаточностью / А.П. Баранов, Ю.П. Гапоненков, А.Д. Парамонов, С.Г. Мусселиус, А.Г. Бузин // Лечебное дело. -2005.-№3. -С. 63-66.
11. Баратова, Д.А. Иммуногенетические HLA – маркеры I и II классов у больных с множественной миеломой // Д.А. Баратова, М.А. Баратова // Современные проблемы науки и образования. -2014, № 3. -С. 530.
12. Барышников, А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака / А.Ю. Барышников // Вестн. Рос. АМН. – 2004. – № 12. – С. 6–10.
13. Белова, А.В. Изучение факторов прогноза выживаемости больных с множественной миеломой в условиях городской многопрофильной больницы / А.В. Белова, Л.М. Боженова, О.А. Костина [и др.] // Здоровоохранение Дальнего Востока. -2009.-№ 2. – С. 50–52
14. Бережная, М.Н. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз / М.Н. Бережная -Киев, 1988. -143 с.
15. Богданов, А.Н. Клиническая гематология / А.Н. Богданов, В.И. Мазуров – СПб. :Фолиант, 2008. – 484 с.
16. Бочарова, О.А. Адгезионная концепция в биологии злокачественного роста / О.А. Бочарова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. -2014, № 2. -С. 87-93.
17. Быков, В.А. История и перспективы изучения лекарственных растений, обладающих противоопухолевой активностью / В.А. Быков, А.М. Рабинович, Н.И. Сидельников // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. -2013, № 11. -С. 011-015.
18. Васильев, В.И. Дифференциальная диагностика дискразий в ревматологической практике / В.И. Васильев, В.Р. Городецкий, О.А. Логвиненко, Н.А. Пробатова, Е.Ю. Варламова, А.И. Павловская, М.А. Френкель, С.Х. Седышев, С.Г. Пальшина, Е.Л. Насонов // Современная ревматология. -2010, № 4. -С. 16-24.
19. Васильев, В.И. Новые подходы к определению органных поражений при AL-амилоидозе / В.И. Васильев, В.Р. Городецкий, С.Г. Раденска-

Лоповок, Н.А. Пробатова, А.И. Павловская, Е.Ю. Варламова, С.Х. Седышев, О.А. Логвиненко, Е.Б. Родионова, Ю.О. Корсакова, И.В. Гайдук, Е.Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. -2012, №1. -С. 83-90.

20. Вашкевич, Е.П. Противоопухолевая активность цитотоксических клеток периферической крови у детей с острым лимфобластным лейкозом / Е.П. Вашкевич // Иммунопатология, аллергология, инфектология. -2011, № 1. -С.6-13.

21. Возианов, А.Ф. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства / А.Ф. Возианов, А.К. Бутенко, К.П. Зак— Киев: Наукова думка, 1998. — С. 38–67

22. Войцеховский В.В., Ландышев Ю.С., Григоренко А.А., Целуйко С.С., Гоборов Н.Д. Множественная миелома. Современные принципы диагностики и лечения // монография. Благовещенск. -2012. – 140 с.

23. Войцеховский, В.В. Лечение больных множественной миеломой препаратом «Велкейд» / В.В. Войцеховский, Ю.С. Ландышев, В.В. Есенин, Т.В. Есенина, Н.С. Скрипкина, Е.А. Малиновская, А.В. Груздова, Н.В.Макарова // Дальневосточный медицинский журнал. -2009. -№4. -С. 63-65.

24. Войцеховский, В.В. Особенности диагностики и лечения пневмонии у больных множественной миеломой / В.В. Войцеховский, Ю.С. Ландышев, А.А. Григоренко, Т.А. Савинова, С.Ю. Ландышев, С.А. Горячева, В.П. Мишук // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. -2013, № 50. -С. 23-29.

25. Волкова, М.А. Клиническая онкогематология / М.А. Волкова - М.: Медицина, 2001.- 576 с.

26. Вотякова О.М., Демина Е.А. Множественная миелома // Клиническая онкогематология /под редакцией М.А. Волковой, издание второе переработанное и дополненное. М, 2007., с. 847-871.

27. Вотякова О.М., Демина Е.А. Множественная миелома // Клиническая онкогематология /под редакцией М.А. Волковой, издание второе переработанное и дополненное. –М., 2007., -С. 847-871.

28. Вотякова, О.М. Клиническое значение исследования свободных легких цепей иммуноглобулинов при множественной миеломе / О.М. Вотякова, Н.В. Любимова, Т.А. Турко, О.Ю. Якимович, И.Н.Когарко // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. -2010. Т. 21, №4. -С. 16-22.

29. Вотякова, О.М. Клиническое значение исследования свободных цепей иммуноглобулинов при множественной миеломе / О.М. Вотякова, Н.В. Любимова, Т.А. Турко, О.Ю. Якимович, И.Н. Когарко // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. -2010. Т. 21, № 4. -С. 16-22.

30. Гаммапатии: применение молекулярного иммунохимического метода определения свободных легких цепей иммуноглобулинов в сыворотке крови больных (часть 1) / Когарко И.Н., Барышников А.Ю., Голенков А.К. [и др.] // Рос. биотерапевтич. журн. -2009, №1. –С. 75–80.

31. Голенков, А.К. Клиническое значение анализа свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки при множественной миеломе с различным ответом на химиотерапию / А.К. Голенков, Т.А. Митина, Т.Д. Луцкая, М.В. Козлова, И.Н. Когарко, З.Г. Кадагидзе, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. -2007. -Т. 6, №3. -С. 71-75.

32. Горюнов, И.В. Выбор способа реконструкции после гастрэктомии у больных раком желудка: диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.00.27 / Горюнов Илья Владимирович.: - Москва, -2008. - 99 с.

33. Грачева, Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток / Т.А. Грачева // Клинич. лаб. диагностика. 2008. -№2. - С. 54-55.

34. Давыдов, М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ. / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.-2008; №19.-С.19-21.

35. Добротина, Н.А. Хемилюминесценция в оценке гомеостаза человека / Н.А. Добротина, Г.П. Ежова - Н-Новгород, 1991. – 104 с.
36. Долгих, Т.И. Лабораторная диагностика – основа информационного обеспечения диагностического процесса при оппортунистических инфекциях [обзор литературы] //Клин. лаб. диагностика. – 2008. – № 1. – С. 49–51
37. Зверева, О.Н. Множественная миелома у населения Архангельска / О.Н. Зверева // Гематология и трансфузиология. -2012, Т. 57. -№ S3. -С. 110-111.
38. Земсков, В.М. Хемилюминесценция крови / В.М. Земсков // Методические рекомендации, 1988. -231 с.
39. Златник, Е.Ю. Характеристика общего и локального клеточного иммунитета у больных раком яичника / Е.Ю. Златник, Г.А. Неродо, А.В. Бахтин, И.А. Новикова, Э.Т. Мкртчян, А.Ю.Арджа // Международный журнал экспериментального образования. -2014. -№1. -С. 72-75.
40. Зупанец, И.А. Внеантибиотические свойства макролидов и их модуляции воспалительной реакции / И.А. Зупанец, Е.М. Ткаченко, Т.С. Сахарова // Экспериментальная и клиническая фармакология. -2012. Т. 75, № 12. -С. 41-45.
41. Ильина, Н.А. Динамика количественных показателей клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном бластоцитозе / Н.А. Ильина, Н.М. Касаткина // Вестник Чувашского государственного педагогического университета им. И.Я. Яковлева. -2011. -№4-1. -С. 17-21.
42. Иммунодефицитные состояния / под ред. В.С. Смирнов, И.С. Фрейдлин. – СПб.: Фолиант, 2000. – 568 с.
43. Кадагидзе, З.Р. Цитокины. / З.Р. Кадагидзе // Практонкол. -2003. Т.4, №3. -С. 2—9.
44. Капланов, К.Д. Опыт мобилизации аутологических периферических стволовых кроветворных CD34+ клеток при множественной миеломе // К.Д. Капланов, Л.С. Трегубова, С.В. Егоров, Т.Ю. Клиточенко, И.В. Матвеева,

К.С. Момотюк, А.Л. Шипаева // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. -2010, № 1. -С. 77-81.

45. Каршиева, С.Ш. Мезенхимные стволовые клетки как средство противоопухолевой терапии / С.Ш. Каршиева, Л.С. Красикова, А.В. Белявский Молекулярная биология. -2013. Т. 47, № 1. -С. 50.

46. Кенбаева, Д.К. Показатели клеточного иммунитета при специфической иммунотерапии рака шейки матки / Д.К. Кенбаева, А.Ф. Лазарев // Вестник Кыргызско-Российского славянского университета. -2013. -Т. 13, №4. -С. 115-118.

47. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. - Изд. Фолиант:2008г. - 552 с.

48. Кишкун, А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практик / А.А. Кишкун -М: Медицинское информационное агентство, 2006.-536 с.

49. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / Под ред. М.А.Волковой. — М.: Медицина, -2001. — 576 с : ил

50. Ковальчук Л.В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии / Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская, Р.Я. Мешкова. - :ГЭОТАР-Медиа. -2011, -640 с.

51. Коршунов, Г.В. Цитокины в сыворотке крови больных с опухолями костей / Г.В. Коршунов, Н.Н. Павленко, Д.М. Пучиньян, Е.В. Гладкова, С.Г. Шахмартова // Клиническая лабораторная диагностика. -2012, № 9. -С. 58-59.

52. Костерина, А.В. Некоторые варианты течения множественной миеломы (случай из практики гематологического отделения РКБ) / А.В. Костерина, А.Р. Ахмадеев // Практическая медицина. -2013, № 1-2 ч. 1 (69). - С. 49-50.

53. Костерина, А.В. Синдром гипервязкости / А.В. Костерина, С.Н. Терехова, С.И. Сафиуллина // Практическая медицина. -2011, № 7 (55). -С. 193-194.

54. Костюкова, М.Н. Плазмобластный вариант множественной миеломы с лимфоидной морфологией злокачественных клеток и экспрессией CD20. Описание наблюдения / М.Н. Костюкова, О.Ю. Якимович, Л.Ю. Гривцова, Н.А. Купрышина, М.А. Френкель, О.М. Вотякова, А.М. Степанова, О.А. Чегринцев, Э.Р. Мусаев, А.М. Ковригина, Е.А. Османов, Н.Н. Тупицын // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. -2011. Т. 4, № 1. -С. 44-49.

55. Круглова, Ю.Д. Трудности диагностики множественной миеломы / Ю.Д. Круглова // Бюллетень медицинских интернет-конференций. -2013. Т. 3, № 3. -С. 764.

56. Ксензова, Т.И. Роль иммунофенотипирования клеток костного мозга и ликвора в диагностике множественной миеломы и плазмоклеточного лейкоза / Т.И. Ксензова, Е.В. Аникина, О.В. Ананьева, О.П. Болдырева, Л.А. Иларионова, Л.В. Шанина // Фундаментальные исследования. -2012.-№8-1. - С. 101-106.

57. Кушлинский, Н.Е. Экспериментальные и клинические исследования системы RANK/RANKL/OPG при метастатических опухолях костей // Н.Е. Кушлинский, А.А. Зуев, Ю.С. Тимофеев //Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. -2014. Т. 12, № 8. -С. 3-11.

58. Ландышев, Ю.С. Поражение желудка и двенадцатиперстной кишки у больных множественной миеломой / Ю.С. Ландышев, А.В. Груздова, В.В. Войцеховский, А.А. Григоренко, Е.М. Дердюк // Дальневосточный медицинский журнал. -2011, № 4. -С. 26-29.

59. Леднева, А.В. Цитокиноterapia в клинической практике / А.В. Леднева, С.Н. Стяжкина, М.Л. Черненкова, Т.А. Борисова, Е.М. Виноходова, В.В. Ларин, Е.В. Третьяков // Современные проблемы науки и образования. - 2011, № 6. -С. 68.

60. Личиницер, М.Р. Рефнот® – новый иммуномодулятор для лечения онкологических больных / М.Р. Личиницер, М.Е. Абрамов, З.Г. Кадагидзе, Е.Г. Славина // Фарматека. -2013, № 17 (270). -С. 30-33.

61. Лучинин, А.С. Вторичные опухоли при множественной миеломе / А.С. Лучинин, Т.П. Загоскина, В.А. Овсепян, Е.Н. Тимкина // Гематология и трансфузиология. -2011. Т. 56, № 5. -С. 14-18.

62. Любимова, Н.В. Современный иммунохимический метод определения содержания свободных легких цепей иммуноглобулинов в сыворотке крови больных моноклональными гаммапатиями / Н. В. Любимова, И.Н. Когарко, О.М. Вотякова, Б.С. Когарко, Т.А. Турко, И.И. Ганеев // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. -2011. -Т. 31, №2. -С. 64-70.

63. Мальцева, В.Н. Респираторный взрыв и особенности его регуляции в периферических нейтрофилах при росте опухоли *in vivo* / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук // Институт биофизики клетки Российской академии наук. Пущино, -2007.

64. Матвеева, Л.В. Интерлейкиновый профиль крови в сопоставлении с выраженностью воспалительного, атрофического и ulcerозного процессов в слизистой оболочке желудка / Л.В. Матвеева, Л.М. Мосина, Е.А. Митина // Фундаментальные исследования. -2013.-№7-1. -С. 133-137.

65. Маянский, А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А.Н. Маянский, Д.Н. Маянский -Новосибирск, 1989. – 198 с.

66. Мелкова, К.А. Осложнения высокодозной терапии у больных множественной миеломой : дис. ... канд. мед. наук. – М., 2004. – 217 с.

67. Митина, Т.А. Оценка остаточной опухоли у больных с множественной миеломой на основании анализа свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови / Т.А. Митина, А.К. Голенков, А.Ю. Барышников, А.В. Караулов, Е.В. Трифонова, Ю.Б. Черных, Е.В. Катаева, Т.Д. Луцкая, Л.Л. Высоцкая, Г.А. Дудина, С.Г. Захаров, А.М. Фомин, Н.В. Любимова, И.Н. Когарко // Альманах клинической медицины. -2013, № 29. - С. 33-36.

68. Множественная миелома / С.С. Бессмельцев, К.М. Абдулкадыров. - СПб.: Диалект, 2004. – С.446.

69. Моисеев, С.И., Степанова Современные принципы диагностики и лечения множественной миеломы // И. Моисеев, Г.Н. Салогуб, Н.В. Степанова. Пособие для студентов IV-VI курсов, интернов и клинических ординаторов. – .: СПбГМУ. – 2006, -С. 39.

70. Морозова, Т.Г. Миеломная болезнь: зависимость сроков наступления ремиссии от иммунохимического варианта заболевания / Т.Г. Морозова, И.А. Литвинова, Т.П. Денисова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. -2011, № 2. -С. 25-26.

71. Мостовой, В.П. Остеосклеротический вариант миеломной болезни. Спорные вопросы врачебной тактики / В.П. Мостовой, В.В. Кисляков, С.Л. Козий, Ю.В. Муравская // Крымский терапевтический журнал. -2012, № 2 (19). -С. 148-149.

72. Муркамилов, И.Т. Случай множественной миеломы, выявленной в стадии терминальной почечной недостаточности / И.Т. Муркамилов, Р.Р. Калиев // Трудный пациент.-2012. Т. 10, №12. -С. 32-35.

73. Назаренко, Г.И. клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун // М.: ОАО «Издательство "Медицина"». -2005. - 243с.

74. Назарова, И.Н. Herpes zoster у больных множественной миеломой на фоне лечения бортезомибом / И.Н. Назарова, М.Н. Протасова, Н.А. Никишина // Онкогематология. -2011, № 3. -С. 35-39.

75. Назарова, М.В. Патологический перелом позвоночника в дебюте миеломной болезни / М.В. Назарова, Б.Н. Бейн, М.А. Конопаткин // Вятский медицинский вестник. -2012, № 4. -С. 30-32.

76. Обратимость тяжелой почечной недостаточности при миеломной болезни / В.А. Варшавский, Л.С. Бирюкова, И.Г. Рехтина [и др.] // Нефрология и диализа. -2009. -№ 3. –С. 257–262.

77. Обрезан, А.Г., Миеломная болезнь трудности диагностики (случай из практики) / А.Г. Обрезан, А.А. Стрельников, А.Н. Богданов, А.В.

Новицкий, А.А. Максимов, А.В. Печенгская // Медицина. XXI век.-2007.-№8. -С. 54-58.

78. Окислительный метаболизм нейтрофильных гранулоцитов крови при предраке и раке желудка / Чердынцева Н. В., Наумов С. А., Удут В. В. и др // Вопр. онкологии. - 1992. - 38, №2. -С. 182-187.

79. Окуроков, А.Н. Диагностика болезней внутренних органов / А.Н. Окуроков// Диагностика болезней системы крови - М.: Мед.лит.,2001.-Т.4.- 512 с.

80. Онкология: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / [Т.П. Попова и др.]; под ред. В.П. Гыбочко. -М.: Издательский центр «Академия», 2008.- 400с.

81. Павлова, А.А. Цитокины и их роль в патогенезе множественной миеломы // А.А. Павлова, И.Е. Павлова, С.С. Бессмельцев // Medline.ru. -2013. Т. 14, № -2. -С. 313-335.

82. Патент на изобретение RUS 2377994 21.05.2008. Способ иммунореабилитации онкозаболеваний / А.Н. Данилин, Л.В. Загребин, С.С. Шестов, Ю.Г. Яновский.

83. Патент на изобретение RUS 2414920 01.12.2009. Средство, обладающие противоопухолевой активностью / С.А. Федореев, Н.И. Кулеш, Н.П. Мищенко, С.П. Ермакова, Т.Н. Звягинцева.

84. Патофизиологические и терапевтические аспекты поражения костей при множественной миеломе / Б.И. Гельцер, Е.А. Кочеткова, Н.Н. Жилкова [и др.] // Клиническая медицина. -2009, №12. -С.14–19.

85. Прохорова, В.И. Противоопухолевая активность гепаринов: действие на опухолевый рост, ангиогенез и метастазирование / В.И. Прохорова, Л.М. Шишло, Н.Н. Колядко, Л.А. Державец, И.А. Косенко, О.П. Матылевич // Онкологический журнал. -2011. Т. 5, № 2 (18). -С. 78-83.

86. Рабсон, А. Основы медицинской иммунологии / А. Рабсон, А. Ройт, П. Делвз. – М.: Мир, 2006. – 320 с.

87. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета статистических программ Statistica / О.Ю. Реброва.–М.: Медиа Сфера, 2006. – 312 с.

88. Ременник, О.И. Иммунные нарушения у больных с множественной миеломой / О.И. Ременник // Здоровье женщины. -2013, № 10 (86). -С. 183.

89. Рехтина, И.Г. Прогностические факторы при множественной миеломе, осложненной почечной недостаточностью / И.Г. Рехтина, Р.Б. Чавынчак // Тер.Арх. -2008.-№1.-С 84–88.

90. Ризопулу, А.П. Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина / А.П. Ризопулу, Ф.Ю. Гариб // Инфекция и иммунитет. -2012. -Т. 2, №3. -С. 581-596.

91. Родина, Е.В. Суточный ритм артериального давления у больных множественной миеломой / Е.В. Родина, А.Г. Булгак, И.А. Искров //Кардиология в Беларуси. -2011, № 3. -С. 13-22.

92. Романенко, Н.А. Влияние уровня ФНО- α на эффективность коррекции анемии у больных лимфопролиферативными заболеваниями / Н.А. Романенко, С.С. Бессмельцев, О.Е. Розанова, Н.С. Карпова, К.М. Абдулкадыров // Онкогематология. -2010.-№3. -С. 22-28.

93. Романенко, Н.А. Патогенез и терапия анемии препаратами рекомбинантного эритропоэтина у онкогематологических больных (обзор современной литературы) / Н.А. Романенко // Онкогематология. -2012, № 3. - С. 22-30.

94. Росси, Ж.Ф. Интерлейкин -6 как терапевтическая мишень при иммунопатологии и онкологических заболеваниях / Ж.Ф. Росси // Иммунология гемопоэза. -2012. Т. 10, № 2. -С. 8-34.

95. Ругаль, В.И. Структурные особенности паренхимы и стромы костного мозга больных множественной миеломы / В.И. Ругаль, С.С. Бессмельцев, Н.Ю. Семенова, М.Н. Зенина, О.М. Одинак // Medline.ru. -2012. Т. 13, № -2. -С. 515-523.

96. Рукавицин, О.А. Множественная миелома и родственные заболевания / О.А. Рукавицин, Г.И. Сидорович - М.: Бином, 2006. - 214 с
97. Руководство по гематологии / А.И. Воробьев.- М.:Ньюдиамед, Т1, 2003.-383 с.
98. Руководство по гематологии: в 3 т. Т. 2. Под ред. Воробьева А. И. 3-е изд., перераб. и допол. М.: Ньюдиамед; 2003. — 280 с.
99. Рыжко, В.В. «Несекретирующая» множественная миелома (обзор литературы и собственные наблюдения) / В.В. Рыжко, А.А. Клодзинский, Е.Ю. Варламова, М.С. Сатаева, И.Б. Капланская, И.М. Накостоев, О.В. Параскевова // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. -2010. Т. 3, № 3. -С. 270-277.
100. Салогуб, Г.Н. Поражение почек при множественной миеломе / Г.Н. Салогуб, Н.В. Степанова, О.Ю. Подгаецкая // Гематология и трансфузиология. -2010. Т. 55, № 3. -С. 25-33.
101. Сахапова, Г.Ф. Содержание интерлейкина -6 в ротовой жидкости у пациентов с множественной миеломой / Г.Ф. Сахапова, Л.П. Герасимова, М.Ф. Кабирова, И.Н. Усманова, Л.М. Масягутова, И.Д. Рыбаков // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. -2009.-№4. -С. 217-219.
102. Свистунов, А.А. Особенности костного метаболизма у больных множественной миеломой / А.А. Свистунов, А.В. Рута, О.В. Шевченко // Саратовский научно-медицинский журнал. -2010. Т. 6, № 1. -С. 048-052.
103. Семочкин, С.В. Биологические основы применения иммуномодулирующих препаратов в лечении множественной миеломы / С.В. Семочкин // Онкогематология. -2010. -№1. -С. 21-31.
104. Сендерова, О.М. Почечная недостаточность у больных с различными иммунохимическими вариантами множественной миеломы / О.М. Сендерова, Г.М. Орлова – М.: Медицина для всех. - 2005. – 268 стр.
105. Серебренникова, С.Н. Интерлейкин-1, интерлейкин-10 в регуляции воспалительного процесса / С.Н. Серебренникова, И.Ж. Семинский, Н.В.

Семенов, Е.В. Гузовская // Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск). - 2012. Т. 115, № 8. -С. 005-007.

106. Симонян, В.А. Случай диспротеинемической полиневропатии / В.А. Симонян, О.Р. Чмыхалова, С.К. Евтушенко, А.М. Гнилорыбов, Я.А.Гончарова // Международный неврологический журнал. -2010, № 3. -С. 82-83.

107. Скворцов, В.В. Миеломная болезнь случай из практики / В.В. Скворцов, О.А. Лешина // Медицинский алфавит. -2012. -Т. 4, №24. -С. 56-58.

108. Скворцова, Н.В. Эффективность таргентной терапии множественной миеломы с использованием ингибиторов протеасом / Н.В. Скворцова, Т.В. Мельникова, Е.В. Мельниченко, А.В. Мишенин //Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. -2011. Т. 31, -№ 2. -С. 94-100.

109. Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т., И Москов В.И. особенности клеточного и гуморального иммунитета у больных острыми нелимфобластными и лимфобластными лейкозами //Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск) - 2006. Т. 59. № 1. С. 35-38.

110. Смирнова, О.В. Роль неспецифического иммунитета при прогрессировании миеломной болезни / О.В. Смирнова, В.Т. Манчук, Ю.Н. Агилова // Современные проблемы науки и образования. -2014, № 2. -С. 515.

111. Смирнова, О.В. Состояние иммунного статуса и особенности цитокиновой регуляции у больных на разных стадиях миеломной болезни // О.В. Смирнова, В.Т. Манчук, Ю.Н. Агилова // Фундаментальные исследования. -2014, № 6-1. -С. 78-82.

112. Смирнова, О.В. Хронические лейкозы клинические и иммунологические особенности возникновения и развития / О.В. Смирнова, А.А. Савченко, В.Т. Манчук // Новосибирск: "Наука", 2012. – 127 с.

113. Смирнова, О.В. Хронический миелолейкоз клинические и иммунологические особенности у взрослых больных / О.В. Смирнова

Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. -2012, №3. -С. 185-189.

114. Соколовский, А.В. Сравнение и достоверность прогностических систем у пациентов с поражением позвоночника множественной миеломой и плазмцитомой / Соколовский А.В., Вотякова О.М., Николаев А.П., Мусаев Э.Р. // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. -2013.-№1. -С. 11-14.

115. Справочник гематолога. А-Z/ Бэйн Б. Дж., Гупта Р.; Пер. с англ. Мосоловой Т. П.; Под ред. Рукавицына О. А. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний.-2004. –С. 280.

116. Степанов, А.В. Перспективы использования нового регулятора гуморального иммунитета в онкологии / А.В. Степанов, В.Л. Цепелев, С.Л. Цепелев, Н.Н. Цыбиков, А. Бямбаа // Забайкальский медицинский вестник. - 2013, № 1. -С. 125-129.

117. Тарасова, Т.А. Интерлейкин -6 и его рецептор в сыворотке крови больных опухолями и опухолеподобными поражениями костей / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук // Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук. Москва, 2010.

118. Тотолян, А.А. Клетки иммунной системы / А.А. Тотолян, И.С. Фрейдлин // Учебное пособие. - СПб.: Наука, 2000. - 231 с.

119. Трудности диагностики множественной миеломы, дебютировавшей синдромом ОПН / Е.О. Щербакова, А.В. Ватазин, Е.И. Прокопенко [и др.] // Нефрология и диализ. -2006, № 4. -С.370–374.

120. Усс, А.Л. Множественная миелома: парадигмы диагностики и лечения / А.Л. Усс // Медицинские новости. -2012. -№ 9, (216). -С. 4-8.

121. Фомина, Т.В. Сравнительный анализ электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови в диагностике миеломной болезни // Т.В. Фомина, О.В. Островский, В.Е. Веровский // Клиническая лабораторная диагностика. -2012, № 2. -С. 16-18.

122. Хаит, Е.А. Изменения в системе протеина С у больных множественной миеломой / Е.А. Хаит, Ю.А. Наместников, О.Ю. Матвиенко, О.А. Смирнова, О.Г. Головина, В.М. Шмелева, Э.И. Подольцева, К.М. Абдулкадыров, Л.П. Папаян // Гематология и трансфузиология. -2011. Т. 56, № 5. -С. 3-6.
123. Човдхури, П.Р. Инновационные методы диагностики множественной миеломы / П.Р. Човдхури, М.И. Крючков, Е.А. Зинина, С.П. Морозов, Б.М. Бродецкий // Терапевтический архив. -2011. Т. 83, № 4. -С. 14-17.
124. Чубукина, Ж.В. Неспецифические факторы защиты и гуморальный иммунитет у больных множественной миеломой / Ж.В. Чубукина, Л.Н. Бубнова, С.С. Бессмельцев, Г.В. Глазанова, О.Е. Розанова, И.Е. Павлова // Медицина экстремальных ситуаций. -2012, № 2. -С. 93-98.
125. Шевченко, О.П. Электрофорез в клинической практике / О.П. Шевченко, В.В. Долгов, Г.А. Олефиренко, -2008
126. Широкова, И. Инновации становятся ближе / И. Широкова // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. - 2013, № 11. -С. 26-27.
127. Шулутко, Б.И. Стандарты диагностики и лечение внутренних болезней / Б.И. Шулутко, С.В. Макаренко -СПб.: ЭЛБИ, 2007. С.381–384.
128. Щепеткин, И.А. Регуляция функциональной активности нейтрофилов цитокинами / И.А. Щепеткин, Н.В. Чердынцева, Н.В. Васильева // Иммунология. -1994. -№1. -С.4-6.
129. Энгельхард, М.А. Миеломная болезнь – успех в лечении или новые препараты? / М.А. Энгельхард // Медицинский совет. -2011.-№ 1-2. -С. 47-54.
130. Эфрон, А.Г. Цитокины – как иммуномодуляторы течения раневого процесса / А.Г. Эфрон // Математическая морфология: электронный математический и медико-биологический журнал. -1998. -Т. 3, №1. -С. 217-221.

131. Ярилин, А.А. Основы иммунологии / А.А. Ярилин. -М.:Медицина, 1999.– 608 с.
132. Ярилин, А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии / А.А. Ярилин // Иммунология.- 1997.- №3.- С. 7-12.
133. Abe, M. Targeting the interplay between myeloma cells and the bone marrow microenvironment in myeloma / M. Abe, J. Int // Hematol. -2011, Oct. – V.94, №4. –P.34-43.
134. Aksungar, F.B. A triclonal gammopathy in a relapsing multiple myeloma patient, detected by immunosubtraction method / F.B. Aksungar, M. Ayer, M. Serteser, A. Coskun, I.Unsal // Ann Clin Biochem. -2013 Dec 20.- V. 14. –P. 76-80
135. Allen, R.C. Biochem. / R.C. Allen, R.L. Stjernholm, R.H. Steele // Biophys. Res. Commun. –V. 47. –P. 679.
136. Altinier, S. An IgE multiple myeloma: contradictory findings in clinical laboratory testing / S. Altinier, G. Barberio, M. Varagnolo, M. Zaninotto, A. Furlan, L. Caberlotto, M. Plebani // Clin Chim Acta. -2013, -V. 21. –P.15-18
137. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends / H.L. Howe, P.A. Wingo, M.J. Thun [et al.] // J Natl Cancer Instr.- 2001. №93.P.24—42.
138. Arnason, J. Evolution of cellular immunotherapy: from allogeneic transplant to dendritic cellvaccination as treatment for multiple myeloma / J. Arnason, D. Avigan // Immunotherapy.-2012 Oct. –V.4, №10. –P.43-51.
139. Bazzoni, F. The tumor necrosis factor ligand and receptor families / F. Bazzoni, B. N Beutler // Engl J Med. -1996. –V.334. –P.17—25.
140. Bemelmans, M.H. Tumor necrosis factor:function, release and clearance / M.H. Bemelmans, L.J. van Tits, W.A. Buurman // Crit Rev Immunol. - 1996. V.16. –P.1—11.

141. Berlier, C. Infectious complications in elderly with chronic hematological malignancies / Berlier C, Erard V. // *Rev Med Suisse*. 2013 Oct 9;9(401):1821-6. Review. French.

142. Bianchi, G. Molecular mechanisms of effectiveness of novel therapies in multiple myeloma / G. Bianchi, I.M. Ghobrial // *Leuk Lymphoma*. -2013, Feb. – V.54, №2. –P. 29-41.

143. Bianchi, G. The heavy chain diseases: clinical and pathologic features / G. Bianchi, K.C. Anderson, N.L. Harris, A.R. Sohani // *Oncology (Williston Park)*. -2014, Jan. –V.28, №1. P.45-53.

144. Bogner, E. Pattern of the epitope-specific IgG/IgM response against human cytomegalovirus in patients with multiple myeloma / E. Bogner, G. Pecher // *Clin Vaccine Immunol*. -2013. –V. 20, №8. –P.98-104.

145. Bradwell, A. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig'κ/Ig'λ ratios in multiple myeloma patients / A. Bradwell, S. Harding, N. Fourrier, C. Mathiot, M. Attal, P. Moreau, J.L. Harousseau, H. Avet-Loiseau // *Leukemia*. -2013. --V.27, №1, -P.2-7.

146. Braga, W.M. Is there any relationship between gene expression of tumor antigens and CD4(+) T cells in multiple myeloma? / W.M. Braga, B.R. da Silva, V.L. Alves, A.B. Bortoluzo, D. Atanackovic, G.W. Colleoni // *Immunotherapy*. -2014. –V.6, №5. –P.69-75.

147. Brahmer, J.R. Immune checkpoint blockade: the hope for immunotherapy as a treatment of lung cancer? / J.R. Brahmer // *Semin Oncol*. - 2014, Feb. –V.41, №1. –P.26-32.

148. Brahmer, J.R. Modified cIg-FISH protocol for multiple myeloma in routine cytogenetic laboratory practice / L. Gole, A. Lin, C. Chua, W.J. Chng // *Cancer Genet*. -2014, Jan-Feb. –V.207, №1-2. –P.1-4.

149. Chapman, M.A. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma / M.A. Chapman, M.S. Lawrence, J.J. Keats, K. Cibulskis, C. Sougnez, A.C. Schinzel, C.L. Harview, J.P. Brunet, G.J. Ahmann, M. Adli, K.C. Anderson, K.G. Ardlie, D. Auclair, A. Baker, P.L. Bergsagel, B.E. Bernstein, Y. Drier, R.

Fonseca, S.B. Gabriel, C.C. Hofmeister, S. Jagannath, A.J. Jakubowiak, A. Krishnan, J. Levy, T. Liefeld, S. Lonial, S. Mahan, B. Mfuko, S. Monti, L.M. Perkins, R. Onofrio, T.J. Pugh, S.V. Rajkumar, A.H. Ramos, D.S. Siegel, A. Sivachenko, A.K. Stewart, S. Trudel, R. Vij, D. Voet, W. Winckler, T. Zimmerman, J. Carpten, J. Trent, W.C. Hahn, L.A. Garraway, M. Meyerson, E.S. Lander, G. Getz, T.R. Golub // *Nature*. -2011, Mar 24. –V.471(7339). –P.67-72.

150. Chaudhuri, D. Targeting the immune system in cancer / D. Chaudhuri, R. Suriano, A. Mittelman, R.K. Tiwari // *Curr Pharm Biotechnol*. -2009, -V.10, №2. -P. 166—84.

151. Chesi, M. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates / M. Chesi, P.L. Bergsagel // *Int J Hematol*. -2013, Mar. –V.97, №3. –P.:13-23.

152. Claudio, J.O. A Molecular Compendium of Genes Expressed in Multiple Myeloma / J.O. Claudio, E.M. Khan, H. Tang, J. Goncalves, M. Voralia, Z.H. Li, V. Nadeem, E. Cukerman, O. Francisco-Pabalan, C.C. Liew, J. Woodgett, A.K. Stewart // *Blood*. -2002. –V.100. –P.175-186.

153. Culić, S. Immune thrombocytopenia: serum cytokine levels in children and adults / S. Culić, I. Salamunić, P. Konjevoda, S. Dajak, J. Pavelić // *Med Sci Monit*. -2013, Sep 27, V. 19. –P. 797-801.

154. Danylesko, I. Monoclonal antibody-based immunotherapy for multiple myeloma / I. Danylesko, K. Beider, A. Shimoni, A. Nagler // *Immunotherapy*. - 2012 Sep. –V.4, №9. –P.19-38.

155. Dayyani, F. Autologous stem-cell transplantation restores the functional properties of CD14+CD16+ monocytes in patients with myeloma and lymphoma / F. Dayyani, A. Joeinig, L. Ziegler-Heitbrock, R. Schmidmaier, C. Straka, B. Emmerich, G.J. Meinhardt // *Leukoc Biol*. -2004. –V.75, №2. –P.7-13.

156. de Haart, S.J. Accessory cells of the microenvironment protect multiple myeloma from T-cell cytotoxicity through cell adhesion-mediated immune resistance / S.J. de Haart, N.W. van de Donk, M.C. Minnema, J.H. Huang, T. Aarts-Riemens, N. Bovenschen, H. Yuan, R.W. Groen, D.W. McMillin, J.

Jakubikova, H.M. Lokhorst, A.C. Martens, C.S. Mitsiades, T.Mutis // Clin Cancer Res. -2013. -V.19, №20. –P. 91-101.

157. de la Puente, P. Contemporary drug therapies for multiple myeloma / P. de la Puente, A.K. Azab // Drugs Today (Barc). -2013, Sep. –V.49, №9. –P.63-73.

158. de Rezende, L.C. Regulatory T cell as a target for cancer therapy / L.C. de Rezende, I.V. Silva, L.B. Rangel, M.C. Guimaraes // Arch Immunol Ther Exp (Warsz). -2010. -V. 58, №3. -P. 179–90.

159. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha / L.G. Corral, P.A. Haslett, G.W. Muller [et al.] // J Immunol. -1999. V.163, №1. –P. 3-6.

160. Dogaru, M. Correlations among different markers determined by immunochemical methods used for the diagnosis and monitoring of intact immunoglobulin multiple myeloma cases / M. Dogaru, V. Lazăr, D. Coriu // Roum Arch Microbiol Immunol. -2012, Oct-Dec. V.-71, №4. –P.183-200.

161. Early myeloablative therapy for multiple myeloma/ R.A. Alexanian, M.A. Dimopoulos, I.A. Hester. [et al.] // Blood. – 1994. – V. 84. – P. 4278 – 4282.

162. Eslick, R. Multiple myeloma: from diagnosis to treatment / R. Eslick, D. Talaulikar // Aust Fam Physician. -2013, Oct. –V.42, №10. –P.84-88.

163. Fonseca, R. Myeloma: classification and risk assessment / R. Fonseca, J. Monge // Semin Oncol. -2013. –V.40, №5. –P.54-66.

164. Freedman, A. Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management / A. Freedman // American Journal of Hematology. -2014, Apr. – V.89, №4. –P.29-36.

165. Garfall, A.L. Cellular immunotherapy for plasma cell myeloma / A.L. Garfall, D.T. Vogl, B.M. Weiss, E.A. Stadtmauer // Bone Marrow Transplant. - 2013, Nov. -V.48, №11. –P. 77-86.

166. Guo, Y. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer / Y. Guo, F. Xu, T. Lu, Z. Duan, Z. Zhang // Cancer Treat Rev. -2012, -P.38, №7.- P.4-10.

167. Hajek, R. Myeloma stem cell concepts, heterogeneity and plasticity of multiple myeloma / R. Hajek, S.A. Okubote, H. Svachova, J. Br // *Haematol.* - 2013, Dec. -V163, №5. -P.51-64.

168. Heher, E.C. Kidney disease and multiple myeloma / E.C. Heher, H.G. Rennke, J.P. Laubach, P.G. Richardson // *Clin J Am Soc Nephrol.* -2013, Nov, V.8, №11. -P.17.

169. Hirt, C. "In vitro" 3D models of tumor-immune system interaction /C. Hirt, A. Papadimitropoulos, V. Mele, M.G. Muraro, C. Mengus, G. Iezzi, L. Terracciano, I. Martin, G.C. Spagnoli // *Adv Drug Deliv, Rev.* 2014 May 9. -V.10. -P.23-28.

170. International staging system for multiple myeloma / P.R. Greipp, J. San Miguel, B.G. Durie, J.J. Crowley, B. Barlogie, J/ Bladé [et al.] // *J Clin Oncol.* - 2005. -V. 23. -P. 3412-3420.

171. Jain, P. Update on the Biology and Treatment Options for Hairy Cell Leukemia / P. Jain, N. Pemmaraju, F. Ravandi // *Curr Treat Options Oncol.* -2014, Mar. -V. 21. -P. 13-15.

172. Junxun, L. Comparing five diagnostic criteria for multiple myeloma: a retrospective study of 227 cases / L. Junxun, L. Juan, T. Xiuzhen, O. Juan, Z. Bohuang, L.Junru // *Tumori.* -2014. -V.100, №2. -P.7-13.

173. Jurisic, V. Clinical stage-depending decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients / V. Jurisic, T. Srdic, G. Konjevic, O. Markovic, M. Colovic // *Med Oncol.* -2007. -V.24, №3. -P.2-7.

174. Kachuri, L. Multiple pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in Canadian men / L. Kachuri, P.A. Demers, A. Blair, J.J. Spinelli, M. Pahwa, J.R. McLaughlin, P. Pahwa, J.A. Dosman, S.A.Harris // *Int J Cancer.* - 2013, -V.133, №8. -P.46-58.

175. Kastritis, E. Preserved levels of uninvolved immunoglobulins are independently associated with favorable outcome in patients with symptomatic multiple myeloma / E. Kastritis, F. Zagouri, A. Symeonidis, M. Roussou, A. Sioni, A. Pouli, S. Delimpasi, E. Katodritou, E. Michalis, M. Michael, E. Hatzimichael,

A. Vassou, P. Repousis, A. Christophoridou, Z. Kartasis, E. Stefanoudaki, C. Megalakaki, S. Giannouli, M.C. Kyrtsionis, K. Konstantopoulos, M. Spyroupoulou-Vlachou, E. Terpos, M.A. Dimopoulos. *Leukemia*. -2014, Mar. –V.18. –P.110.

176. Kim, J. Vivid tumor imaging utilizing liposome-carried bimodal radiotracer // J. Kim, D.N. Pandya, W. Lee, J.W. Park, Y.J. Kim, W. Kwak, Y.S. Ha, Y. Chang, G.I. An, Yoo J. // *ACS Med Chem Lett*. -2014, Feb.-V. 45, №4. – P.1-4.

177. Kim, S.K. Characteristics of unexpected protein bands in multiple myeloma patients after autologous stem cell transplantation / S.K. Kim, T.D. Jeong, S.Y. Kim, W. Lee, S. Chun, C.W. Suh, W.K. Min // *Clin Biochem*. -2014, Feb. –V.25. –P. 13-15.

178. King, R.L. IgM multiple myeloma: pathologic evaluation of a rare entity / R.L. King, M.T. Howard, J.M. Hodnefield, W.G. Morice // *Am J Clin Pathol*. -2013, Oct. –V.140, №4. –P.19-24.

179. Koshy, N. Oligosecretory biclonal multiple myeloma / N. Koshy, M.G. Ong, M.L. Nordberg, F. Turturro, J.D. Cotelingam // *J La State Med Soc*. -2013, Jul-Aug. –V.165, №4. –P.215-217.

180. Liang, J. Role of Interleukin-6 in Differentiating Interleukin-11 Induced Fever and Early Bacterial Infection / J. Liang, Z. Lei, X. Xu, N., Zhao H. Song, S. Yang, F. Zhao, J. Mao, C. Liao, D. Shen, Y. Tang // *Indian J Pediatr*. - 2014 Mar 28.

181. Lonial, S. Non-secretory myeloma: a clinician's guide / S. Lonial, J.L. Kaufman // *Oncology (Williston Park)*. -2013, Sep. –V.27, №9. –P.4-8.

182. Madu, A. Pattern of CD4 T-lymphocyte Values in Cancer Patients on Cytotoxic Therapy / A. Madu, S. Ocheni, O. Ibegbulam, E. Aguwa, K. Madu // *Ann Med Health Sci Res*. -2013. –V.3, №4. –P. 49-50.

183. Mohundro, M.M. On the horizon for multiple myeloma / M.M. Mohundro, B.L. Mohundro, J. Am // *Manag Care*. -2012, -V.18, №3, -P.3.

184. Morrison, V.A. Infections in patients with leukemia and lymphoma / V.A. Morrison // *Cancer Treat Res*. -2014, -V.161. –P.19-49.

185. Myeloma stem cell concepts, heterogeneity and plasticity of multiple myeloma / Hajek R, Okubote SA, Svachova H. // *Br J Haematol.* 2013 Dec;163(5):551-64. doi: 10.1111/bjh.12563. Epub 2013 Sep 20. Review.

186. Neben, K. Progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del(17p), t(4;14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load / K. Neben, A. Jauch, T. Hielscher, J. Hillengass, N. Lehnert, A. Seckinger, M. Granzow, M.S. Raab, A.D. Ho, H. Goldschmidt, D.Hose // *J Clin Oncol.* -2013, -V.1.-P.25-32.

187. Neri, P. Genomic instability in multiple myeloma: mechanisms and therapeutic implications / P Neri, N.J. Bahlis // *Expert Opin Biol Ther.* -2013, Jun. -V.13. -Suppl 1. -P. 69-82.

188. Oranger, A. Cellular mechanisms of multiple myeloma bone disease / A. Oranger, C. Carbone, M. Izzo, M. Grano // *Clin Dev Immunol.* -2013.

189. Ovarian cancer cells modulate human blood neutrophils response to activation in vitro / M. Klink et al. // *Scand. J. Immunol.* - 2008. - V. 68. - P. 328-336.

190. Owlia, M.B. Visual Problem and Low Back Pain as Initial Manifestation of Multiple Myeloma Complicating Pre-existing Systemic Sclerosis / M.B. Owlia, O. Distler, M. Foratyazdi, M.J. Akhtari // *Coll Physicians Surg Pak.* -2014, Mar, -V.24. -P.29-31.

191. Paiva, B. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile / B. Paiva, T. Paino, J.M. Sayagues, M. Garayoa, L. San-Segundo, M. Martín, I. Mota, M.L. Sanchez, P. Bárcena, I. Aires-Mejia, L. Corchete, C. Jimenez, R. Garcia-Sanz, N.C. Gutierrez, E.M. Ocio, M.V. Mateos, M.B. Vidriales, A. Orfao, J.F. San Miguel // *Blood.* -2013. -V.122, №22. -P.1-8.

192. Pandey, S.1 Unusual myelomas: a review of IgD and IgE variants / S. L. Pandey, R.A. Kyle // *Oncology (Williston Park).* -2013, Aug. -V.27, №8. - P.798-803.

193. Peng, J. *Patrinia scabiosaefolia* extract suppresses proliferation and promotes apoptosis by inhibiting the STAT3 pathway in human multiple myeloma cells / J. Peng, Y. Chen, J. Lin, Q. Zhuang, W. Xu, Z. Hong, T.J. Sferra // *Mol Med Rep.* -2011, Mar-Apr. –V.4, №2. –P.3-8.

194. Piazza, F. Novel players in multiple myeloma pathogenesis: role of protein kinases CK2 and GSK3 / F. Piazza, S. Manni, G. Semenzato // *Leuk Res.* - 2013, Feb. –V.37, №2. –P1-7.

195. Primary bone spinal lesions. / M.J. Ederson, P.V. Hitchon, J.M. Duff [et al.] // In Benzel EC, editors. *Spine surgery*. New York: Churchill Livingstone. - 1999. -V.10. – P. 228–236.

196. Raja, K.R. Flow cytometry based enumeration and functional characterization of CD8 T regulatory cells in patients with multiple myeloma before and after lenalidomide plus dexamethasone treatment / K.R. Raja, M. Plasil, L. Rihova, J. Pelcova, Z. Adam, R. Hajek // *Cytometry B Clin Cytom.* - 2013. –V. 3, №10. –P. 46-50.

197. Raje, N.S. Advances in supportive care for multiple myeloma / N.S. Raje, A.J. Yee, G.D. Roodman // *J Natl Compr Canc Netw.* -2014, Apr. –V.12, №4. –P.2-11.

198. Randles, E.G. Structural alterations within native amyloidogenic immunoglobulin light chains / E.G. Randles, J.R. Thompson, D.J. Martin, M. Ramirez-Alvarado // *J. Mol. Biol.* -2009.-V.389.-P. 199–210.

199. Rechtina, I.G. Morphological and immunochemical features of nephropathies in multiple myeloma and severe renal failure / I.G. Rechtina, E.P. Golitsina, E.Iu. Varlamova, V.A. Varshvskii, A.A. Kireeva, L.S. Biriukova, V.G. Savchenko // *Ter Arkh.* -2013. –V.85, №3. –P.80-85.

200. Rensing-Ehl, A. Abnormally differentiated CD4+ or CD8+ T-cells with phenotypic and genetic features of double negative T-cells in human Fas deficiency / A. Rensing-Ehl, S. Völkl, C. Speckmann, M.R. Lorenz, J. Ritter, A. Janda, M. Abinun, H. Pircher, B. Bengsch, R. Thimme, I. Fuchs, S. Ammann, A. Allgäuer, K. Kentouche, A. Cant, S. Hambleton, C. Bettoni da Cunha, S. Huetker,

I. Kühnle, A. Pekrun, M.G. Seidel, M. Hummel, A. Mackensen, K. Schwarz, S. Ehl // *Blood*. -2014, Jun 3. № 03. –P.23-26.

201. Roeven, M.W. Immunotherapeutic approaches to treat multiple myeloma / M.W. Roeven, W. Hobo, N. Schaap, H. Dolstra // *Hum Vaccin Immunother*. -2013. Dec 11, V.10, №4. –P. 43-44

202. Rosean, T.R. Preclinical validation of interleukin 6 as a therapeutic target in multiple myeloma / T.R. Rosean, V.S. Tompkins, G. Tricot, C.J. Holman, A.K. Olivier, F. Zhan, S. Janz // *Immunol Res*. -2014. –V.21. –P.34-37.

203. Rosenblatt, J. Immunotherapy for multiple myeloma / J. Rosenblatt, M. Bar-Natan, N.C. Munshi, D.E. Avigan // *Expert Rev Hematol*. -2014. –V. 7, №1. –P.1-6.

204. Rousseau, B. Immunotherapies and targeted therapies in medical oncology / B. Rousseau, S. Champiat, D. Loirat, J. Arrondeau, N. Lemoine, J.C. Soria // *Bull Cancer*. -2014, Jan 1. –V.101, №1. –P.1-9.

205. San-Miguel, J.F. New tools for diagnosis and monitoring of multiple myeloma / J.F. San-Miguel, B. Paiva, N.C. Gutiérrez // *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. -2013. –V.10. –P.12-15.

206. Sedlaříková, L. Cytokine profiles of multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia / L. Sedlaříková, K. Sadílková, L. Kubiczková, R. Hájek, S. Sevcíková // *Klin Onkol*. -2014, -V.27, №1, -P.18-23.

207. Seidel, M.G. A novel immunodeficiency syndrome associated with partial trisomy 19p13 / M.G. Seidel, C. Duerr, S. Woutsas, A. Schwerin-Nagel, K. Sadeghi, J. Neesen, S. Uhrig, E. Santos-Valente, W.F. Pickl, W. Schwinger, C. Urban, K. Boztug, E.J. Förster-Waldl // *Med Genet*. -2014, Apr. –V.51, №4. –P.54-63.

208. Shen, C.J. Increased numbers of T helper 17 cells and the correlation with clinicopathological characteristics in multiple myeloma / C.J. Shen, Z.H. Yuan, Y.X. Liu, G.Y.Hu // *J Int Med Res*. -2012. –V.40, №2. –P.56-64.

209. Shin, S.J. Prognostic significance of absolute lymphocyte count/absolute monocyte count ratio at diagnosis in patients with multiple myeloma

/ S.J. Shin, J. Roh, M. Kim, M.J. Jung, Y.W. Koh, C.S. Park, D.H. Yoon, C. Suh, C.J. Park, H.S. Chi, J. Huh // Korean J Pathol. -2013. –V. 47, №6. –P. 26-33.

210. Siegel, D.S. Relapsed/Refractory multiple myeloma: defining refractory disease and identifying strategies to overcome resistance / D.S. Siegel // Semin Hematol. -2012, Jul. –V.49. –P.3-15.

211. Sjö Dahl, G. Infiltration of CD3⁺ and CD68⁺ cells in bladder cancer is subtype specific and affects the outcome of patients with muscle-invasive tumors / G. Sjö Dahl, K. Lövgren, M. Lauss, G. Chebil, O. Patschan, S. Gudjonsson, W. Månsson, M. Fernö, K. Leandersson, D. Lindgren, F. Liedberg, M. Höglund // Urol Oncol. -2014 Apr 29. №14. –P.1-6.

212. Sobol, U. Neurologic aspects of plasma cell disorders/ U. Sobol, P. Stiff // Handb Clin Neurol. -2014. -V.120. –P.83-99.

213. Soubani, A. Outcome and prognostic factors of hematopoietic stem cell transplantation recipients admitted to a medical ICU / A. Soubani, E. Kseibi, J. Bander // Chest. – 2004. – V. 126. – P. 1604–1611.

214. Tarrío, M.L. Proliferation Conditions Promote Intrinsic Changes in NK Cells for an IL-10 Response / M.L. Tarrío, S.H. Lee, M.F. Fragoso, H.W. Sun, Y. Kanno, J.J. O'Shea, C.A. Biron // J Immunol. -2014/ -V.6. –P. 21-25.

215. Tolo, D.A. Characteristics and Results of the Treatment of Multiple Myeloma in the Subject under the Age of 65 at the University Hospital of Yopougon in Abidjan, Côte d'Ivoire / D.A. Tolo, D. Sawadogo, D.C. Nanho, B. Kouakou, N. Méité, R. Ayémou, P. Kouéhion, M. Konan, Y.M. Sékongo, E. N'dhatz, I. Kamara, A. Silué, K.G. Koffi, I. Sanogo // Adv Hematol. -2013. –V. 10. –P. 34-39.

216. Tripathy, S. The role of serum protein electrophoresis in the detection of multiple myeloma: an experience of a corporate hospital / S.J. Tripathy // Clin Diagn Res. -2012. -V.6, №9. –P. 58-61.

217. Yaccoby, S. Advances in the understanding of myeloma bone disease and tumour growth / S. Yaccoby, J. Br // Haematol. -2010, May. –V.149, №3. – P.11-21.

218. Yuan, L. RANKL expression in myeloma cells is regulated by a network involving RANKL promoter methylation, DNMT1, microRNA and TNF α in the microenvironment / L. Yuan, G.C. Chan, K.L. Fung, C.S. Chim // Biochim Biophys Acta. -2014, №26. –P.67-48.

219. Zheng, M.M. The systemic cytokine environment is permanently altered in multiple myeloma / M.M. Zheng, Z. Zhang, K. Bemis, A.R. Belch, L.M. Pilarski, J.E. Shively, J.Kirshner // PLoS One. -2013. –V.8, №3. –P. 12-16.