

О.Ф. Мельников

М.Б. Самбур

В.В. Кищук

К.Н. Веремеенко

Л.Д. Кривохатская

Т.А. Заяц

М.Д. Тимченко

Институт отоларингологии  
им. проф. А.И. Коломийченко  
АМН Украины, Киев, Украина

**Ключевые слова:**

противоопухолевая  
резистентность, небные  
миндалины, биологически  
активные растворимые  
факторы.

## НЕБНЫЕ МИНДАЛИНЫ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОРГАНИЗМА

**Резюме.** Установлено, что выделенные из клеток небных миндалин человека низкомолекулярные диализабельные фракции способны оказывать цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток *in vitro*, не проявляя цитолитической активности в культурах аллогенных эритроцитов и лимфоцитов, стимулировать продукцию ФНО лимфоцитами и модулировать функциональную активность ЕК крови пациентов с онкологическими заболеваниями, что указывает на возможность участия небных миндалин в формировании противоопухолевой резистентности организма. Данные лабораторного исследования подтверждены результатами клинико-статистического анализа связи между наличием у больных новообразований и состоянием небных миндалин, которые свидетельствуют, что злокачественные новообразования органов дыхательной или пищеварительной системы достоверно чаще диагностируют у пациентов с недостаточностью ткани небных миндалин или у перенесших тонзиллэктомию.

**ВВЕДЕНИЕ**

Результаты проведенных в последние десятилетия многопрофильных исследований лимфоэпителиальных образований лимфоглоточного кольца убедительно доказали их важную роль в формировании локальных и системных реакций иммунитета, реализуемых как клеточными, так и гуморальными механизмами, среди которых существенное место занимает продукция лимфоидными и нелимфоидными клетками миндалин многочисленных цитокинов с широким спектром биологической активности [1, 2]. Был предпринят ряд попыток выделения и идентификации биологически активных веществ из клеток миндалин как в целях более детальной расшифровки механизмов межклеточных взаимодействий, так и возможного применения таких веществ в клинической практике в качестве иммуномодуляторов [3, 4]. В наших предыдущих исследованиях с помощью методов препаративной биохимии из лимфоцитов небных миндалин больных с хроническим тонзиллитом (ХТ), оперированных по медицинским показаниям, были выделены диализабельные факторы с молекулярной массой < 25 кД и широким спектром иммуномодулирующей активности. В опытах *in vivo* было установлено, что эти вещества изменяют направление дифференцировки полипотентных стволовых клеток костного мозга мышей в сторону стимулирования пролиферации и дифференцировки клеток лимфоидного ряда, способны переносить гиперчувствительность замедленного типа и усиливать гуморальный иммунный ответ к стрептолизину-О, увеличивать *in vitro* количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD-2 рецепторы, индуцировать продукцию мононуклеарами больных с иммунодефицитным состоянием фактора, стимулирующего дифференцировку Т-лимфоцитов [5, 6].

Целью настоящей работы было изучение роли небных миндалин и продуцируемых ими цитокинов в противоопухолевой резистентности организма и некоторых механизмах ее реализации.

**ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Материалом для лабораторных исследований служили диализаты лимфоцитов миндалин (ДЛМ) 32 больных с ХТ, полученные с помощью ранее описанного метода [5], а также выделенные путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина мононуклеары периферической крови (МПК) у 20 больных раком гортани (РГ), как правило, II–III стадии, второй клинической группы, у 18 пациентов с лимфосаркомой верхних дыхательных путей (ЛСВДП), у которых на момент обследования выявлены нарушения в системе иммунитета, и у 10 практически здоровых лиц (доноров). Клинико-статистический анализ проведен на материалах ретроспективного изучения 120 историй болезни и непосредственного обследования 207 больных обоего пола со злокачественными опухолями, находившихся на лечении в областной клинической больнице и в облонкодиспансере (г. Винница). Возраст больных, среди которых преобладали мужчины (212 человек), колебался от 40 до 68 лет. Спектр злокачественных новообразований включал: опухоли верхних дыхательных путей (РГ, лимфосаркома и рак миндалин, рак и саркома полости носа и придаточных пазух) — у 58 больных, рак легкого — у 76, опухоли органов пищеварения (рак желудка, рак тонкой кишки, рак ободочной и прямой кишки, первичный рак печени, рак желчного пузыря) — у 82, рак молочной железы — у 56, опухоли женских и мужских половых органов (рак шейки матки, рак тела матки, рак яичника; злокачественные опухоли предстательной

железы, семенных пузырьков, яичка) — у 55. Все диагнозы были верифицированы гистологически.

Непосредственную цитотоксическую активность ДЛМ оценивали в серии общепринятых тестов *in vitro*, используя в качестве мишеней клетки линий Нер-2 (карцинома гортани человека), К-562 (эритролейкоз человека), эритроциты и лимфоциты периферической крови доноров и больных РГ. Цитотоксичность ДЛМ для клеток Нер-2 оценивали после витального окрашивания последних с использованием спектрофотометра; для К-562 — радиометрически (используя изотопный маркер  $^{51}\text{Cr}$  («Amersham», Англия)) [7]; для аллогенных лимфоцитов — после окрашивания трепановым синим; эритроцитотоксичность — методом фотокolorиметрии. Наличие в исследуемых образцах ДЛМ фактора некроза опухолей (ФНО) определяли биологическим методом, используя в качестве мишеней чувствительные к цитотоксическому действию ФНО клетки линии L-929, предварительно обработанные актиномицином-D («Serva», ФРГ), и фотометрический метод с кристаллическим фиолетовым [8]. Цитотоксический индекс (ЦИ) рассчитывали по формуле:

$$\text{ЦИ} = (a - v) / a \cdot 100\%,$$

где  $a$  — оптическая плотность лунок со средой,  $v$  — оптическая плотность лунок с ДЛМ, измеряемая при длине волны 540 нм.

Для изучения способности ДЛМ индуцировать цитотоксичность МПК для опухолевых клеток-мишеней (Нер-2, L-929) использовали супернатанты (Сн), полученные после 18 ч инкубации  $2 \cdot 10^6$ /мл МПК доноров или пациентов с онкологическими заболеваниями в присутствии ДЛМ в дозе 2 мкг/мл. Контролем служили Сн клеток, инкубируемых в полной культуральной среде без добавления ДЛМ.

Влияние ДЛМ на уровень естественной цитотоксической активности МПК больных ЛСВДП изучали после инкубации в течение 18 ч клеток-эффекторов и мишеней в среде RPMI-1640 («Serva», ФРГ) с 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) («Serva», ФРГ), 80 мкг/мл гентамицина и 230 мкг/мл L-глутамина («Фармахим», Болгария) в присутствии исследуемых ДЛМ в различных концентрациях (0,2, 2, 20 мкг/мл). В качестве клеток-мишеней использовали эритроциты цыплят, меченные  $^{51}\text{Cr}$  («Amersham», Англия). Контролем служили пробы, не содержащие ДЛМ. Учет реакции осуществляли радиометрически на установке «Гамма-12» (Украина) по методу [9].

Результаты обработаны статистически с использованием непараметрического критерия U Уилкоксона — Манна — Уитни [10]. При проведении статистических исследований применяли метод углового преобразования по Фишеру [11], позволяющий определять степень достоверности из числа наблюдений менее 50.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении прямого цитотоксического действия *in vitro* ДЛМ на опухолевые клетки-мишени

установлено, что максимальная активность исследованных образцов не превышает 20% (пределы индивидуальных колебаний — 14–20%). При этом ни в одном из ДЛМ не выявлено прямой цитотоксической активности по отношению к аллогенным эритроцитам и лимфоцитам. Цитотоксическая активность Сн, полученных в результате инкубации в присутствии ДЛМ МПК доноров, имела пределы индивидуальных колебаний 9–21%, Сн МПК больных с новообразованиями была более выраженной. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют, что обработка ДЛМ МПК как здоровых лиц, так и больных с ЛСВДП стимулирует продукцию фактора (факторов?), оказывающего цитотоксическое действие на клетки Нер-2. Исследование влияния ДЛМ на продукцию МПК больных РГ ФНО позволило выявить, что лимфоциты этих больных, как правило, и без добавления исследуемых факторов небных миндалин продуцируют ФНО, будучи, по видимому, индуцированы к его выработке уже *in vivo*. Добавление ДЛМ в инкубационную среду достоверно повышало уровень цитолитической активности Сн, что свидетельствует о способности изучаемых ДЛМ стимулировать продукцию иммунокомпетентными клетками ФНО (см. табл. 1). Следует отметить, что обработка ДЛМ МПК практически здоровых лиц и особенно пациентов с онкологическими заболеваниями приводит к появлению в Сн цитотоксических факторов, активность которых превышает собственную цитотоксичность ДЛМ для опухолевых клеток-мишеней.

Таблица 1  
Влияние ДЛМ на цитотоксичность Сн МПК практически здоровых лиц (доноров) и больных ЛСВДП

Больные	Воздействие <i>in vitro</i> ДЛМ	Цитотоксический индекс для клеток-мишеней, %					
		Нер-2			L-929		
		М*	ПК	p	М	ПК	p
Доноры	+	15,0	9,0–21,0	<0,01	Не исследовали		
	–	0,0	0,0–0,0				
Больные с ЛСВДП	+	26,0	18,0–34,0	<0,01	Не исследовали		
	–	0,5	0,0–1,0				
Больные РГ	+	Не исследовали			48,8	19,0–61,0	<0,05
	–				32,4	10,0–45,0	

\* Здесь и в табл. 2 приведены статистические показатели: М — средние значения, ПК — пределы индивидуальных колебаний, p — достоверность отличий.

Одним из существенных показателей противоопухолевой резистентности организма является уровень функциональной активности естественных цитотоксических клеток (ЕЦК). Влияние различных концентраций ДЛМ на функциональное состояние ЕЦК 18 больных с ЛСВДП было изучено в тестах *in vitro* (табл. 2). Показано, что ДЛМ обладают модулирующим действием по отношению к функции ЕЦК, направленность которого зависит от исходного уровня активности этих клеток и практически не зависит от концентрации ДЛМ в диапазоне изученных доз. При этом исходно высокие уровни активности ЕЦК при воздействии ДЛМ снижаются, тогда как исходно сниженные показатели эффективно стимулируются.

Таблица 2  
Влияние ДЛМ на функциональную активность ЕЦК больных с ЛСВДП

Статистический показатель	Активность ЕЦК, %			
	Исходный уровень	При добавлении ДЛМ в дозе, мкг/мл		
		0,2	2	20
М**	13,6	29,8	28,9	31,3
ПК**	0,0–23,9	0,0–42,5	0,0–67,5	0,0–59,0
n*	11	8	11	10
p**		= 0,05	< 0,05	< 0,05
M	44,2	31,4	30,7	26,2
ПК	26,1–64,5	13,0–61,0	11,8–60,0	13,2–39,5
n	6	5	6	6
p		> 0,05	> 0,05	> 0,05

\* n — число наблюдений; \*\* — как в табл. 1.

Полученные нами результаты тестирования ДЛМ свидетельствуют, что небные миндалины продуцируют биологически активные факторы, оказывающие *in vitro* прямое цитотоксическое действие на клетки-мишени опухолевого происхождения, влияют на продукцию цитокинов (в том числе ФНО) МПК здоровых лиц и особенно больных с ЛСВДП или РГ, стимулируют или нормализуют функциональную активность ЕЦК у больных с ЛСВДП, что позволяет отнести небные миндалины к органам, способным активно модулировать некоторые механизмы противоопухолевой резистентности организма. Подтверждением этой точки зрения могут служить результаты изучения влияния ДЛМ на рост у мышей карциномы Льюис, показавшие, что введение препарата приводит к задержке появления опухолей у мышей опытной группы и достоверному повышению содержания у них в крови больших гранулоцитосодержащих лимфоцитов [12].

Косвенным доказательством участия небных миндалины в формировании и реализации противоопухолевой резистентности могут, на наш взгляд, служить и данные клинико-статистического изучения связи онкологических заболеваний с наличием и состоянием небных миндалины. При обследовании выделяли группы больных со злокачественными новообразованиями без признаков патологии со стороны небных миндалины, с ХТ (независимо от его формы) и больных, которым проводили тонзиллэктомию (давность операции в среднем составляла 35,5 года) или у которых выявлена гипоплазия миндалины. Предварительный анализ полученных материалов показал, что наличие у больных патологии миндалин в виде ХТ не коррелирует с более частым выявлением у них онкологических заболеваний различных органов. Поэтому при окончательной статистической обработке данных все больные были распреде-

лены на 2 группы: 1-я — пациенты с наличием миндалины (объединяющая лиц с ХТ и без патологии миндалины) и 2-я — больные с недостаточностью ткани миндалины (объединяющая пациентов с гипоплазией ткани миндалины и перенесших тонзиллэктомию). Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что статистически достоверные данные, свидетельствующие о связи между наличием опухоли и состоянием небных миндалины, получены в группах больных со злокачественными новообразованиями органов дыхательной системы (верхних дыхательных путей, легких) или пищеварительного тракта. Таким образом, установлено, что у пациентов с онкологическими заболеваниями органов дыхательного и пищеварительного тракта достоверно чаще выявляют недостаточность ткани небных миндалины. Это позволяет предположить, что лимфоэпителиальные образования глоточного кольца, находясь на стыке дыхательного и пищеварительного тракта, участвуют в реакциях противоопухолевой резистентности, реализуемой как клеточными механизмами, опосредуемыми различными группами содержащихся в миндалинах клеток-киллеров, так и продуцируемыми иммунокомпетентными клетками миндалины растворимыми факторами, обладающими цитотоксическими и регуляторными свойствами [12–14]. Дальнейшие клинико-экспериментальные исследования призваны подтвердить такое участие, уточнить его для отдельных нозологических форм и более точно идентифицировать его механизмы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мельников ОФ. Современные представления о роли лимфоглоточного кольца в реакциях иммунитета в норме и патологии. Иммунология та алергология 1998; (1): 64–8.
2. Brandtzaeg P. Development in Tonsillar Lymphoid Follicles. Acta Otolaryngol 1996; 523 (suppl): 55–9.
3. Хавинсон ВА, Мороз ВГ, Хмельницкая НГ, Серый СВ. Способ получения иммуностимулятора. (СССР) А.с. №1522485 А1, МКИ А61 К35/30. Заявл. 23.11.87.
4. Хмельницкая НМ. Функциональная морфологическая характеристика тимуса и вторичных органов иммуногенеза при воздействии тималина и тонзиллина. В: Физиология, морфология и патология тимуса. Москва: Медицина, 1986: 30–3.
5. Мельников ОФ, Самбур МБ, Кишук ВВ и др. Иммунологическая активность диализабельной фракции лимфоцитов миндалины больных хроническим тонзиллитом. Иммунология та алергология 2000; (1): 58–62.
6. Мельников ОФ, Самбур МБ, Тимченко СВ и др. Иммунобиологическая активность растворимых факторов из лимфоцитов гипертрофированных образований лимфоглоточного кольца. Иммунология та алергология 1999; (3): 57–8.

Таблица 3

Состояние небных миндалины у больных со злокачественными новообразованиями различной локализации

Локализация опухоли	Число больных	Средний возраст, лет	Распределение в зависимости от состояния небных миндалины				p <sub>1-2</sub>
			1-я группа		2-я группа		
			Абс. число	%	Абс. число	%	
ВДП (гортань, миндалины, полость носа и придаточные пазухи)	58	55	13	22,4	45	77,6	< 0,05
Легкое	53	52,6	9	11,8	67	88,2	< 0,05
Молочная железа	56	45	19	33,9	37	66,1	> 0,05
Пищеварительный тракт (желудок, тонкая, ободочная, прямая кишка, печень, желчный пузырь)	82	43,6	27	32,9	55	67,1	< 0,05
Половые органы (матка, яичник; предстательная железа, семенные пузырьки, яичко)	55	48,5	28	50,9	27	49,1	> 0,1

7. Hayward A. Non specific induction of cytotoxicity by human lymphocytes with human IgG. Immunol 1974; 25: 61–5.

8. Дяченко НС, Спивак НЯ, Тарасишин ЛА и др. Современные методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона и его индукторов. Метод рекомендации. Киев, 1994. 18 с.

9. Мельников ОФ, Лазарь АФ, Литус ВИ, Балицкая НА. Использование изотопной метки в реакциях цитолиза. Лаб дело 1985; (1): 40–2.

10. Гублер ЕВ, Ганкин АА. Применение непараметрических критериев в медико-биологических исследованиях. Ленинград: Медицина, 1973. 141 с.

11. Аффи А, Эйзен С. Статистический анализ: подход с использованием ЭВМ. Москва: Мир, 1982: 141–64.

12. Лакіза СО. Імунобіологічна дія діалізабельних чинників із лімфоцитів піднебінних мигдаликів хворих на хронічний тонзиліт [Автореф дис ... канд мед наук]. Київ: Інститут отоларингології, 1998. 20 с.

13. Мельников ОФ, Заяц ТА, Рыльская ОГ, Кривохатская ЛД. Влияние тималина и тактивина на функциональную активность различных субпопуляций цитотоксических клеток небных миндалин больных хроническим тонзиллитом. Журн ушных носовых и горловых болезней 1991; (4): 6–10.

14. Okada T, Nishimura T, Yagisawa M, Naito K. The role of NK cells in human tonsillar tissue (mainly focussing on the change of tonsillar tissue with aging). Acta Otolaryngol 1987; 454 (Suppl): 96–108.

## PALATAL GLANDS AND ANTITUMOR RESISTANCE

O.F. Melnikov, M.B. Sambur, V.V. Kischouk,  
K.N. Veremeenko, L.D. Krivokhatkaya,  
T.A. Zayats, M.D. Timchenko

**Summary.** *Low-molecular dialyzable fractions extracted from the palatal glands are shown to be capable of exerting a cytotoxic effect on tumor cells in vitro with no cytolytic activity in cultures of xenogenic and allogenic erythrocytes, to stimulate the TNF production; and to modulate the functional activity of NK cells in the blood of oncological patients. This points to the possible involvement of palatal glands in the formation of anti-tumor resistance. Laboratory findings are supported by the results of clinical and statistical analysis of the association between tumor processes and the state of the palatal glands. This analysis shows that the rate of patients with deficiency of the tissue of palatal glands or those after tonsillectomy is statistically higher among patients with malignant tumors of the respiratory or alimentary systems.*

**Key Words:** antitumor resistance, palatal glands, biologically active soluble factors.