



ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИЗУЧЕНИЯ УРОВНЕЙ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Л.Т. Алимходжаева

РОНЦ МЗ Республики Узбекистан, Ташкент

DIAGNOSTIC VALUE OF STUDYING THE LEVELS OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES OF THE IMMUNE SYSTEM IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

L.T. Alimkhodjaeva

Republican Cancer Research Center, Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Tashkent

The diagnostic value of the serum levels of proinflammatory (TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines of the immune system was studied in 54 patients with breast cancer (BC). Analysis identified the increased concentrations of proinflammatory cytokines, such as IL-1 β , TNF- α , and IL-6, in the peripheral sera of BC patients.

Analysis of anti-inflammatory cytokines in the peripheral sera of patients with BC also revealed a significant increase in the values of IL-4 and IL-10. The findings suggest that there is imbalance between cellular and humoral immunity factors, the study of which will be an important diagnostic criterion for BC.

Key words: proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, immunity, immunopathogenesis, breast cancer

Введение

Онкологические заболевания являются наиболее привлекательной и в то же время сложной областью изучения и применения цитокинов в качестве иммунотерапевтических средств. Многообразие биологических эффектов цитокинов, их ключевая роль как медиаторов взаимодействий в поддержании гомеостаза предполагают участие их во многих патологических процессах, в том числе и при злокачественных новообразованиях. Известно, что патогенез многих патологических процессов обусловлен нарушением баланса в системе цитокинов [1—4]. С учетом различного рода сведений о значительной роли цитокинов в развитии патологических процессов организма представляется целесообразным исследование изменений цитокинового спектра при онкологических процессах [3, 5—8]. Эти исследования особенно важны для понимания механизма развития злокачественных новообразований.

Благодаря современным достижениям фундаментальной иммунологии, молекулярной биологии, биотехнологии и генетики в настоящее время в арсенале исследователей появились биологически значимые показатели, которые могут помочь в диагностике, лечении и прогнозировании различных заболеваний, а также в выборе иммунотерапевтических подходов к терапии. В связи с этим в последние годы большое внимание уделяется цитокинам, которые являются своеобразным межклеточным языком, позволяющим клеткам общаться и взаимодействовать [1, 9—11].

На сегодняшний день все исследования в области определения цитокинового профиля основаны на применении антицитокиновой или цитокиновой терапии в эксперименте или в клинических испытаниях. Так, известно, что при выборе стратегии цитокиновой или антицитокиновой терапии следует учитывать, что цитокины могут способствовать аутокринному или паракринному росту и метастазированию опухолей, если они секретируются самими опухолевыми клетками, экспрессирующими рецепторы для этих цитокинов, или клетками микроокружения, инвазирующими опухоль (например, макрофаги, фибробласты, стромальные клетки) [7, 8, 12—15].

В литературе освещаются многогранные аспекты изучения цитокинов при злокачественных процессах. Однако, несмотря на многочисленные работы в области изучения уровней цитокинов, многие вопросы комплексного анализа цитокинов при онкологических заболеваниях, в частности, при раке молочной железы (РМЖ), требуют дальнейшего изучения. Цитокиновый спектр представляет собой интегральный показатель, определение и анализ которого являются необходимым клиническим и лабораторным критерием в диагностике иммунодефицитных состояний.

Материалы и методы

Нами исследованы образцы сывороток периферической крови 54 больных РМЖ (средний возраст 54,2 $\pm$ 4,5 года) с гистологически верифицированными злокачественными новообразованиями молочных желез и 20 практически здоровых жен-

щин аналогичного возраста. Все пациентки были госпитализированы в отделение маммологии РОНЦ МЗ РУз. Диагноз устанавливали на основании данных клинико-лабораторных и морфологических методов исследования. Сбор материала осуществлялся до проведения оперативных вмешательств, химио- и лучевой терапии. Все пациентки с РМЖ имели III стадию заболевания. У них диагностированы аденокарцинома, инфильтративный РМЖ.

Изучение цитокинового спектра в сыворотке периферической крови, включающее определение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, а также интерферонов (ИФН), проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем «Вектор-Бест», Россия, Новосибирск (2005—2009). Тест-системы основаны на сэндвич-методе твердофазного ИФА с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента. Количественная оценка результатов, отражающих зависимость оптической плотности от концентрации для стандартного антигена, осуществлялась с использованием программы Excel 2008. Чувствительность метода при использовании данных тест-систем составила 2—30 пг/мл.

Наборы реагентов для определения фактора некроза опухоли (ФНО- α), интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИФН- γ представляют собой комплект, основными реагентами которого являются моноклональные антитела к исследуемым цитокинам, сорбированные на поверхности лунок разборного полистирольного планшета. Наборы предназначены для количественного определения человеческих цитокинов в сыворотке периферической крови, плазме и биологических жидкостях. Измерение оптической плотности в каждой лунке проводили с использованием автоматического фотометра для микропланшета при длине волны 450 нм.

Результаты и обсуждение

Согласно современным представлениям, иммунная система играет существенную роль в контроле за опухолевым ростом, которая заключается в сдерживании роста и метастазирования опухолей. Работы последних лет показали, что важными

участниками биорегуляции и пролиферации клеток при опухолевых процессах являются цитокины [6, 15, 16].

Нами изучены сывороточные показатели основных про- и противовоспалительных цитокинов, имеющие важное значение в патогенезе РМЖ. Проанализированы данные по исследованию спектра провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИФН- γ) в сыворотке периферической крови больных РМЖ.

Так, при исследовании уровней провоспалительных цитокинов у пациенток с РМЖ выявлено достоверное повышение концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 в сыворотке периферической крови. Так, уровень ФНО- α был достоверно повышен в группе больных РМЖ по отношению к значениям женщин контрольной группы. Уровень ФНО- α при РМЖ составил $26,44 \pm 3,5$ пг/мл, что было в 4,85 раза выше контрольных значений ($p < 0,001$). Следовательно, нами зафиксировано достоверное повышение уровня ФНО- α в группах женщин с РМЖ по отношению к контрольному значению. Полученные результаты представлены в табл. 1. Следует отметить, что, по данным литературы, ФНО- α является иммунологическим маркером злокачественности и прогрессирования онкологического процесса, что почти всегда коррелирует с клиническими проявлениями злокачественных опухолей [9, 17]. Повышенная секреция ФНО- α обусловлена действием ИЛ-1 β . В свою очередь, ФНО- α стимулирует макрофаги, которые продуцируют ИЛ-6 и ФНО- α в высоких концентрациях [18, 19].

Изучение ИЛ-1 β в сыворотке периферической крови больных РМЖ позволило выявить достоверное повышение данного показателя в этой группе пациенток по сравнению со значением контрольной группы. Так, концентрация ИЛ-1 β в среднем у больных РМЖ составила $17,5 \pm 2,96$ пг/мл, тогда как в контрольной группе $9,05 \pm 1,35$ пг/мл, что достоверно различалось между собой ($p < 0,05$). При этом содержание ИЛ-1 β в группе пациенток с РМЖ было повышено в 1,9 раза по сравнению с данными контрольной группы. Следовательно, зарегистрировано достоверное повышение среднего значения ИЛ-1 β в группе больных РМЖ.

Таблица 1. Спектр провоспалительных цитокинов у больных РМЖ ($M \pm m$, пг/мл)

Группа	ФНО- α	Провоспалительные цитокины ИЛ-1 β	ИЛ-6	ИФН- γ
Больные РМЖ ($n=54$)	$26,44 \pm 3,5^*$	$17,5 \pm 2,96^{**}$	$32,8 \pm 2,9^*$	$6,3 \pm 0,82$
Контрольная группа ($n=20$)	$5,45 \pm 1,6$	$9,05 \pm 1,35$	$4,46 \pm 0,83$	$4,55 \pm 0,84$

Примечание. Здесь и далее: *достоверность различий между исследуемыми группами ($p < 0,05$); **достоверность различий между значениями больных РМЖ и контрольной группы ($p < 0,001$).

Известно, что ИЛ-1 β является ключевым провоспалительным цитокином, ведущая роль которого состоит в развитии воспалительного процесса и стимуляции выработки ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-3 и ФНО- α [20, 21]. Одновременно при онкологических процессах важную роль отводят ИЛ-6, который относится к цитокинам семейства ИЛ-1. Очевидно, опухолевые клетки могут продуцировать цитокины в качестве аутокринных ростовых факторов. Так, ИЛ-6 может продуцироваться злокачественными клетками опухолей, при этом его высокий уровень может препятствовать эффективной иммунотерапии. По данным литературы, активация выработки ИЛ-6 приводит к запуску транскрипционных механизмов, которые ускоряют пролиферацию и рост злокачественных клеток [5, 22, 23].

При сравнительном анализе содержания ИЛ-6 в сыворотке крови между средними значениями исследуемых групп больных и контрольной группы обнаружено достоверное повышение его в группе пациенток с РМЖ. Так, сывороточный уровень ИЛ-6 был повышен в группе больных РМЖ в 7,4 раза по сравнению со значением контрольной группы: $32,8 \pm 2,9$ и $4,46 \pm 0,83$ пг/мл соответственно (см. табл. 1).

Часто провести грань между аутокринной и паракринной регуляцией опухолевого роста очень сложно, при этом в любом случае показателями для иммуностимулирующей терапии служат экспрессия цитокиновых рецепторов опухолевыми клетками и высокая концентрация соответствующих цитокинов внутри самой опухоли. Например, показано, что ИЛ-6 является основным аутокринным ростовым фактором при злокачественных новообразованиях [5].

ИЛ-6 — цитокин с широким диапазоном биологической активности, который продуцируется как лимфоидными, так и нелимфоидными клетками. ИЛ-6 регулирует иммунный и острофазный ответы, воспаление, онкогенез и гемопоэз [15, 17]. Также одной из основных функций ИЛ-6 является регуляция процессов созревания антителопродуцирующих клеток из В-лимфоцитов и самой продукции иммуноглобулинов.

Таким образом, высокое содержание ИЛ-6 в сыворотке периферической крови, характерное для больных РМЖ, служит важным диагностическим критерием злокачественности онкологического процесса.

Не установлено достоверной разницы в отношении уровня ИФН- γ в сыворотке крови между исследуемыми группами. Однако наблюдается некоторая тенденция к повышению ИФН-

γ в группе больных РМЖ. Так, содержание ИФН- γ в группе пациенток с РМЖ составило $6,30 \pm 0,82$ пг/мл, тогда как в группе контроля — $3,52 \pm 1,4$ пг/мл ($p > 0,05$). ИФН- γ относится к цитокинам, продуцируемым Тх1-клетками. Он активирует моноциты и макрофаги, продукцию цитокинов, натуральные киллеры (цитотоксичность), пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, пролиферацию и продукцию цитокинов Тх2-лимфоцитами, пролиферацию В-лимфоцитов, секрецию иммуноглобулинов G, усиливает дифференцировку опухолевых клеток [24]. Следовательно, при анализе сывороточного содержания ИФН- γ достоверных различий с контрольной группой не зафиксировано.

Таким образом, имела место активация провоспалительных цитокинов, причем достоверные различия между исследуемыми группами выявлены по содержанию ИЛ-1 β , ФНО- α и ИЛ-6, которые идентифицировались в повышенных концентрациях в сыворотке периферической крови больных РМЖ.

Далее был изучен спектр противовоспалительных цитокинов при РМЖ. Анализ противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-10) в сыворотке крови больных РМЖ показал, что уровень ИЛ-4 в этой группе составил $6,55 \pm 1,68$ пг/мл, тогда как в группе контроля — $3,86 \pm 1,15$ пг/мл. Установлено достоверное повышение среднего значения ИЛ-4 в группе пациенток с РМЖ по отношению к контрольной группе ($p < 0,001$). При этом уровень ИЛ-4 у больных РМЖ был повышен в 2,5 раза. Полученные данные представлены в табл. 2. Следовательно, при РМЖ прослеживается повышение содержания ИЛ-4, являющегося выраженным противовоспалительным медиатором, вырабатываемым лимфоцитами Тх2-типа и обладающим местной противоопухолевой активностью, которая стимулирует в дальнейшем популяцию Т-цитотоксических лимфоцитов.

Также показано, что опухолевые клетки сами могут продуцировать такие цитокины, как ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО- α , которые являются ростовыми факторами, обуславливающими иммунорезистентность опухолевой ткани [17, 25, 26].

Уровень ИЛ-10 в сыворотке крови больных РМЖ был повышен в 1,81 раза по сравнению

Таблица 2. Спектр противовоспалительных цитокинов у больных РМЖ ($M \pm m$, пг/мл)

Группа	Противовоспалительные цитокины	
	ИЛ-4	ИЛ-10
Больные РМЖ ($n=54$)	$6,55 \pm 1,68^*$	$14,85 \pm 2,04^{**}$
Контрольная группа ($n=20$)	$3,86 \pm 1,15$	$8,22 \pm 1,5$

с группой контроля: $14,85 \pm 2,04$ и $8,22 \pm 1,5$ пг/мл соответственно (см. табл. 2).

Таким образом, существует определенный дисбаланс в содержании про- и противовоспалительных цитокинов при РМЖ. Зафиксированы повышенные концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 в сыворотке периферической крови на фоне недостоверного изменения уровня ИФН- γ . По данным литературы, активация выработки ИЛ-6 и ФНО- α приводит к супрессии Т-клеточного звена иммунитета, что клинически выражается иммунодефицитом [27–31].

При анализе противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-10) в сыворотке крови больных РМЖ выявлено достоверное повышение

обоих цитокинов, вырабатываемых Тх₂-клетками. Известно, что баланс между про- и противовоспалительными цитокинами рассматривается как важнейший фактор, определяющий иммунопатогенез неоплазий [2, 16, 32, 33]. На основании полученных данных можно сделать заключение о функциональной активности как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. При этом уровень ИФН- γ , который вырабатывается Тх₁-клетками, достоверно не различался с данными контрольной группы. Средние значения противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) и ИЛ-6 были значительно повышены, что указывало на активность выработки цитокинов Тх₂-клетками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кетлинский С. А., Ищенко А. М. Цитокины и их антагонисты: теория и практика. Мед иммунол 1999;1 (3–4):16.
2. Кетлинский С. А. Роль Т-хелперов типов 1 и 2 в регуляции клеточного и гуморального иммунитета. Иммунология 2002;23(2):77–9.
3. Пинегин Б. В., Хаитов Р. М. Иммунодиагностика заболеваний, связанных с нарушением иммунитета. Гематол трансфузиол 1997;42(2):40–4.
4. Furtado G., Curotto de Lafaille M., Kutchukhize N. et al. Interleukin-2 signaling is required for CD4(+) regulatory T-cell function. J Exp Med 2002;196:851–7.
5. Кадагидзе З. Г. Новые подходы к регуляции противоопухолевого иммунитета. Маммология 2007;(1):10–3.
6. Тугуз А. Р. Динамика содержания TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4 и IL-8 в раннем послеоперационном периоде у больных раком желудка. Иммунология 2002;23(1):59–61.
7. Ярилин А. А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и патологии. Иммунология 1997;(5):7–12.
8. Ciardiello F., Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res 2001;7(10):2958–70.
9. Кетлинский С. А. Современные аспекты изучения цитокинов. Rus J Immunol 1999;4(Suppl 1):46–52.
10. Ломакин М. С., Бочко Г. М. Медиаторы системы иммунологического надзора. Иммунология 1987;(3):17–22.
11. Симбирцев А. С. Цитокины: классификация и биологические функции. Цитокин и воспал 2004;3(2):16–21.
12. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В. Новые возможности лечения цитокинами: иммуоцитотикины в локальной иммунокоррекции. Intern J Immunorehabilitat 1997;(6):57–60.
13. Лукьянова Н. Ю., Кулик Г. И., Чехун В. Ф. Роль генов p53 и bcl-2 в апоптозе и лекарственной резистентности опухолей. Вopr онкол 2000;46(2):121–7.
14. Jonsson J. R., Edwards-Smith C. J., Catania S. C. et al. Expression of cytokines and factors modulating apoptosis by human sinusoidal leucocytes. J Hepatol 2000;32:392–8.
15. Yoshimura A. Singal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. Cancer Sci 2006;97:439–47.
16. Аничков Н. М. Патогенез хакексии при злокачественных опухолях. Арх патол 2005;67(5):51–6.
17. Ballwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? Cytokine Growth Factor Rev 2002;13:135–41.
18. Аббасова С. Г., Липкин В. М., Трапезников Н. Н., Кушлинский Н. Е. Система FAS — FASL в норме и при патологии. Вopr биол мед фарм химии 1999;(3):3–17.
19. Малашенкова И. К., Тазулахова Э. Б., Дидковский Н. А. Интерфероны и индукторы их синтеза. Тер арх 1998;(11):35–9.
20. Симбирцев А. С. Биология семейства интерлейкина-1 человека. Иммунология 1998;(3):9–17.
21. Симбирцев А. С. Механизмы иммуностимулирующего действия интерлейкина-1. Мед иммунол 1999;1(3–4):133–4.
22. Фрейдлин И. С., Кузнецова С. А. Имунные комплексы и цитокины. Мед иммунол 1999;1(1–2):27–36.
23. Ishihara K., Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. Cytokine Growth Factor Rev 2002;13:357–68.
24. Biron A. Interferon α and (β) as immune regulators — a new look. Immunity 2001;14:662–4.
25. Barrat F., Cua D., Boonstra A. et al. In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4⁺ T-cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T-helper type 1 and type 2-inducing cytokines. J Exp Med 2002;195:603–16.
26. Moreau J., Chastagner P., Nakara T. et al. Control of the IL-2 responsiveness of B lymphocytes by IL-2 and IL-4. J Immunol 1995;155:3401–9.
27. Ильина Н. И., Латышева Т. В., Пинегин Б. В., Сетдикова Н. Х. Синдром вторичной иммунной недостаточности (протоколы диагностики и лечения). Иммунология 2000;(5):8–9.
28. Кадагидзе З. Г. Субпопуляции лимфоцитов при злокачественном росте. Вopr онкол 1994;30(1):28–9.
29. Dumoutier L., Renauld J. Viral and cellular interleukin-10 (IL-10)-related cytokines: from structures to functions. Eur Cytokine Netw 2002;13:5–15.
30. Malek T. R. T-helper cells, IL-2 and the generation of cytotoxic T-cells responses. Trends Immunol 2002;23:465–7.
31. Mosmann T., Sad S. The expanding universe of T-cells subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 1996;17:138–46.
32. Труфакин В. А., Шурлыгина А. В. Цитокины и биоритмы. Мед иммунол 2001;3(4):477–87.
33. Antony P., Restifo N. CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell, immunotherapy of cancer, and interleukin-2. J Immunother 2005;28:120–8.
34. Фрейдлин И. С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции. Аллергол астма и клин иммунол 2000;(8):73–80.
35. Smolen J., Maini R. Interleukin-6: a new therapeutic target. Arthritis Res Ther 2006;8 (Suppl 2):5.