

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКОВ

В присутствии аутосыворотки изучена продукция ИЛ1 β , ИЛ2, ИЛ4, ИЛ6 и ФНО α лимфоцитами периферической крови 30 женщин, больных доброкачественными эпителиальными опухолями яичников, и 50 женщин с эпителиальным раком яичников I-IV стадии. Полученные данные позволяют констатировать повышение активности мононуклеарных клеток в процессе прогрессирования эпителиальных опухолей яичников, повышение активности Т-хелперов 2 типа при одновременном снижении активности Т-хелперов 1 типа в периферической крови больных, а также нарушение ИЛ6-зависимого механизма контроля продукции ИЛ1 β и ФНО α лимфоцитами периферической крови больных эпителиальным раком яичников.

В последнее десятилетие отмечается рост заболеваемости эпителиальных опухолей яичников (ЭОЯ), в связи с чем вопросы профилактики, ранней диагностики и эффективности лечения данного заболевания являются весьма актуальными.

Одним из наиболее перспективных направлений современной онкологии является изучение роли иммунной системы в патогенезе опухолей и возможности применения иммунологических методов для их диагностики и лечения. Иммунология канцерогенеза активно изучается на протяжении последних 20 лет. Получены данные, подтверждающие роль иммунной системы в противоопухолевой защите организма, изучаются механизмы, ведущие к деструкции клеток новообразования, а также механизмы феномена иммунологической толерантности клеток опухоли. Особое значение в реализации противоопухолевого иммунитета в настоящее время уделяется цитокинам – биологически активным веществам, продуцируемым иммунокомпетентными клетками и опосредующим все реакции иммунитета, в том числе противоопухолевого [2, 4].

Несмотря на активное изучение роли отдельных цитокинов в реализации противоопухолевого иммунитета, а также возможности применения их в диагностике и лечении опухолей разной локализации, особенности цитокинового обмена у больных ЭОЯ изучены недостаточно. Имеющиеся литературные данные относительно обмена цитокинов у больных ЭОЯ немногочисленны и противоречивы, что диктует необходимость дальнейшего изучения этой проблемы [3, 5, 7, 8, 9].

Цель исследования

Целью исследования стало изучение продукции лимфоцитами периферической крови (ЛПК) больных опухолями яичников отдельных цитокинов: интерлейкина-1 β (ИЛ1 β) и фактора некроза опухоли- α (ФНО α) как цитокинов, обладающих цитотоксической активностью в отношении клеток опухоли; интерлейкина-2 (ИЛ2) и интерлейкина-4 (ИЛ4) как цитокинов, опосредующих клеточную реакцию Т-лимфоцитов по 1 или 2 типу; интерлейкина-6 (ИЛ6) как цитокина, замыкающего воспалительную реакцию и являющегося антагонистом ИЛ1 β и ФНО α .

Методы исследования

Были изучены особенности спонтанной и стимулированной продукции цитокинов ЛПК больных ЭОЯ, находившихся на лечении в Ставропольском краевом онкологическом диспансере в период с 1998 по 1999 гг.

Всего было обследовано 80 больных опухолями яичников. Контрольную группу составили 30 здоровых женщин.

После клинического обследования, проведения УЗИ, КТГ и гистологического исследования образцов удаленных опухолей все больные женщины были распределены на 3 группы: 30 больных доброкачественными эпителиальными опухолями яичников (ДЭОЯ), 20 больных эпителиальным раком яичников I-II стадии (ЭРЯ I-II) и 30 пациенток с эпителиальным раком яичников III-IV стадии (ЭРЯ III-IV).

Выделение ЛПК осуществлялось на градиенте плотности Ficoll-Paque ($\rho=1,077$ г/мл), производства «Pharmacia Fine

Спонтанная и стимулированная продукция ИЛ1 β и ФНО α ЛПК больных ЭОЯ				
Группы пациенток	ИЛ1 β , пкг/мл		ФНО α , пкг/мл	
	Спонтанная, (M \pm m)	Стимулированная, (M \pm m)	Спонтанная, (M \pm m)	Стимулированная, (M \pm m)
Здоровые, n=30	47,5 \pm 4,1	578,4 \pm 60,3 #	58,8 \pm 2,9	981,8 \pm 90,9 #
ДЭОЯ, n=30	617,5 \pm 88,0 *	1556,0 \pm 205,4 * #	1056,0 \pm 72,3 *	2228 \pm 203,5 * #
ЭРЯ I-II, n=20	699,3 \pm 54,7 *	1500,0 \pm 112,5 * #	1114,0 \pm 78,2 *	2267 \pm 157,8 * #
ЭРЯ III-IV, n=30	1506,0 \pm 174,2 **	2270,0 \pm 175,9 ** #	1804,0 \pm 170,1 **	2872 \pm 117,5 ** #

* – различия между больными ЭОЯ и здоровыми женщинами ($p < 0,05$);

** – различия между больными ЭРЯ и больными ДЭОЯ ($p < 0,05$);

– различия между спонтанной и стимулированной продукцией цитокинов ЛПК ($p < 0,05$)

Chemicals» (Швеция), по методу описанному *Woyut* (1968) [6].

Культивирование ЛПК с целью моделирования условий *in vivo* проводили по методике, предложенной Н.М. Бережной и соавт. (1993) [1]. Для этого к клеточной суспензии, содержащей ЛПК в конечной концентрации 2×10^6 /мл среды 199, добавляли 10% ауто-сыворотки обследованных женщин и 40 мкг/мл гентамицина. Для оценки стимулированной продукции цитокинов в полученные клеточные суспензии добавляли по 20 мкг/мл фитогемагглютинина (ФГА) производства «ПанЭко» (Россия). Клеточные суспензии инкубировали в течение 24 часов при 37 $^{\circ}$ C и 100% влажности в атмосфере 5% CO $_2$. После истечения срока культивирования супернатанты очищали центрифугированием при 800 g в течение 30 мин, собирали в стерильные пластиковые пробирки типа «Эппендорф» и хранили до тестирования при -30 $^{\circ}$ C не более 6 мес.

Уровень цитокинов в культуральных средах определялся методом твердофазового иммуноферментного анализа (ИФА) на планшетном фотометре «Labsystems iEMS Reader MF» (Швеция) с помощью наборов реагентов ТОО «Протеиновый контур» (Россия). По данным титрования стандар-

тных образцов строились калибровочные графики для каждого из цитокинов, по которым в исследуемых образцах определялась концентрация ИЛ1 β , ИЛ2, ИЛ4, ИЛ6 и ФНО α .

Статистическая обработка данных проводилась на компьютере PENTIUM 300 с использованием программы «Primer Biostatistic 4.03». Для всех показателей, полученных у женщин основной и контрольной группы, определялись средние значения (M), а также стандартная ошибка среднего (m). Для оценки достоверности различий между значениями использовался простой критерий Стьюдента. Различия между показателями считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

По нашим данным (табл. 1), спонтанная и стимулированная продукция ИЛ1 β и ФНО α лимфоцитами всех больных опухолями яичников вне зависимости от степени их злокачественности и распространения опухолевого процесса выше, чем у здоровых женщин. Увеличение продукции этих цитокинов прогрессирует с распространением рака яичников, вследствие чего лимфоциты больных ЭРЯ III-IV стадии продуцируют большее количество ИЛ1 β и

ФНО α , чем лимфоциты больных доброкачественными опухолями.

В ответ на стимуляцию ФГА мононуклеарные клетки здоровых женщин увеличивают продукцию ИЛ1 β 12,3 раза и ФНО α в 17 раз, у больных опухолями яичников продукция этих цитокинов в ответ на стимуляцию возрастает всего в 1,5-2 раза.

Полученные данные относительно продукции ИЛ1 β и ФНО α ЛПК больных ЭОЯ соответствуют данным литературы и убедительно подтверждают факт повышенной исходной цитотоксической активности мононуклеарных клеток у этих больных. Снижение способности мононуклеаров отвечать повышением продукции ИЛ1 β и ФНО α связано с достижением максимальной активности этих клеток, при которой их дальнейшая активация невозможна.

При изучении продукции выделенными из периферической крови лимфоцитами интерлейкина-2 и интерлейкина-4 (табл. 2) нами установлено достоверное снижение спонтанной и стимулированной продукции ИЛ2 только у больных раком яичников по сравнению со здоровыми женщинами и больными доброкачественными опухолями. Лимфоциты больных ДЭОЯ продуцируют такое же количе-

Таблица 2

Спонтанная и стимулированная продукция ИЛ2 и ИЛ4 ЛПК больных ЭОЯ				
Группы пациенток	ИЛ2, МЕ/мл		ИЛ4, пкг/мл	
	Спонтанная, (M±m)	Стимулированная, (M±m)	Спонтанная, (M±m)	Стимулированная, (M±m)
Здоровые, (n=30)	110,2±0,9	116,1±0,7 #	25,7±1,0	33,7±1,9 #
ДЭОЯ, (n=30)	110,6±1,0	115,6±0,4 #	37,9±3,6 *	53,7±5,4 * #
ЭРЯ I-II, (n=20)	105,5±1,3 **	113,2±0,5 ** #	42,4±4,5 *	52,5±5,2 * #
ЭРЯ III-IV, (n=30)	104,2±1,4 **	113,1±0,3 ** #	62,4±5,2 **	85,9±8,8 ** #

* – различия между больными ЭОЯ и здоровыми женщинами (p<0,05);

** – различия между больными ЭРЯ и больными ДЭОЯ (p<0,05);

– различия между спонтанной и стимулированной продукцией цитокинов ЛПК (p<0,05)

Таблица 3

Спонтанная и стимулированная продукция ИЛ6 ЛПК больных ЭОЯ		
Группы пациенток	ИЛ6, пкг/мл	
	Спонтанная (M±m)	Стимулированная (M±m)
Здоровые, (n=30)	5409±534	14880±142 #
ДЭОЯ, (n=30)	14030±233 *	15070±149
ЭРЯ I-II, (n=20)	15360±209 *	14600±172 #
ЭРЯ III-IV, (n=30)	15630±152 *	14700±147 #

* – различия между больными ЭОЯ и здоровыми женщинами (p<0,05);

** – различия между больными ЭРЯ и больными ДЭОЯ (p<0,05);

– различия между спонтанной и стимулированной продукцией цитокинов ЛПК (p<0,05)

ство ИЛ2, что и лимфоциты здоровых женщин.

В отличие от ИЛ2, продукция ИЛ4 возрастает с прогрессированием опухолевого процесса. При этом ЛПК всех больных опухолями яичников вне зависимости от их злокачественности и степени распространения продуцируют больше ИЛ4, чем ЛПК здоровых женщин, а лимфоциты больных раком продуцируют больше ИЛ4, чем лимфоциты больных доброкачественными опухолями яичников.

Лимфоциты больных ЭОЯ сохраняют способность отвечать увеличением продукции ИЛ2 и ИЛ4 на стимуляцию ФГА, что свидетельствует о сохраненных резервных возможностях проти-

воопухолевой активности Т-лимфоцитов у этих больных.

Снижение продукции ИЛ2 и повышение концентрации ИЛ4 у больных опухолями яичников в процессе прогрессирования опухоли позволяет предположить наличие иммунной перестройки, которая проявляется в преимущественной активации Т-хелперов 2 типа, за дифференцировку которых отвечает ИЛ4 [2, 4].

По нашим данным (табл. 3), спонтанная продукция ИЛ6 лимфоцитами больных ЭОЯ выше, чем у здоровых женщин, вне зависимости от степени злокачественности и распространенности опухоли. В отличие от базальной, стимулированная продукция ИЛ6

больных опухолями яичников не отличается от таковой у здоровых женщин.

При сравнении спонтанной и стимулированной продукции ИЛ6 ЛПК больных ЭОЯ нами установлено, что, в отличие от лимфоцитов здоровых женщин, которые отвечают повышением продукции ИЛ6 на стимуляцию ФГА, лимфоциты больных ДЭОЯ не реагируют на неспецифическую иммуностимуляцию повышением продукции ИЛ6, а лимфоциты больных ЭРЯ в ответ на стимуляцию ФГА снижают продукцию этого интерлейкина.

Подобная парадоксальная реакция лимфоцитов больных опухолями яичников в отношении про-

дукции ИЛ6 может быть объяснена достижением максимальной активности клеток, продуцирующих ИЛ6, и истощением их компенсаторных возможностей.

Выводы

1. Мононуклеарные клетки периферической крови больных ЭОЯ находятся в состоянии повышенной активации, которая прогрессирует с распространением опухолевого процесса.

2. Снижение интенсивности иммунного ответа мононуклеаров периферической крови больных ЭОЯ в ответ на неспецифическую иммуностимуляцию свидетельствует об истощении потенциала активации этих клеток.

3. На фоне повышенной продукции ИЛ1 β и ФНО α резко выраженная декомпенсация резервных возможностей ЛПК больных ЭОЯ, продуцирующих ИЛ6, указывает на гиперпродукцию цитокинов, обладающих противоопухолевой цитотоксичностью, и на нарушение механизмов, регулирующих их синтез.

4. Снижение у больных ЭОЯ иммунного ответа мононуклеаров периферической крови в ответ на стимуляцию и нарушение защитных механизмов, контролирующих продукцию ИЛ1 β и ФНО α , делает сомнительной эффективность неспецифической иммунотерапии этих больных.

5. Снижение продукции ИЛ2 и повышение продукции ИЛ4 ЛПК больных ЭОЯ свидетельствует о нарушении активности Т-клеточных реакций 1 типа у этих больных и делает применение рекомбинантных препаратов ИЛ2 методом выбора в противоопухолевой терапии ЭОЯ.

Литература

1. Бережная Н.М., Ковальчук Б.В., Осипова Е.В. Влияние продуктов культивирования опухолевых клеток различного гистогенеза на функциональную активность лимфоцитов крови человека в зависимости от чувствительности опухолевых биоптатов к ИЛ-2 //

Экспериментальная онкология. – 1993. – Том 10, № 3. – С. 46-50.

2. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. – Киев: Наукова думка, 1998. – 317 с.

3. Володько Н.А., Билинский Б.Т., Кадар О.В. Оценка активности фактора некроза опухоли (ФНО) у онкологических больных // Вопросы онкологии. – 1994. – Том 40, №4-6. – С. 181-185.

4. Грачева Л.А. Цитокины в онкогематологии. – М.: Алтус, 1996. – 122 с.

5. Яковлева Н.В., Аксенова Н.Я., Ковальчук Л.В., Павлюк А.С. Иммунорегуляторная роль моноцитов при злокачественных опухолях яичников // Тезисы доклада I Съезда иммунологов России, Новосибирск, 23-25 июня, 1992. – Новосибирск, 1992. – С. 580.

6. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol.21, N3. – P. 77-82.

7. Elsässer-Beile U., von Kleist S., Gallati H., Pfeleiderer A. Evaluation of cytokine levels in whole cell cultures of patients with gynaecological tumors as diagnostic parameters // Anticancer Res. – 1991. – Vol. 11, N3. – P. 1093 – 1095.

8. Schöndorf T., Engel H., Lindemann C., Kolhagen H., von Rücker A.A., Mallmann P. Cellular characteristics of peripheral blood lymphocytes and tumour-infiltrating lymphocytes in patients with gynaecological tumours // Cancer Immunol. Immunother. – 1997. – Vol.44, N2. – P. 88-96.

9. Schöndorf T., Engel H., Kurbacher C.M., Brenne U., Kolhagen H., Göhring U.J., Scharl A., Mallmann P. Immunologic features of tumor-infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes in ovarian cancer patients // J. Soc. Gynecol. Investig. – 1998. – Vol.5, N2. – P.102 – 107.