

На правах рукописи

Великая Наталья Викторовна

**ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩАЯ ФУНКЦИЯ КЛЕТОК И ЦИТОКИНЫ
СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения РАМН (г. Новосибирск)

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
доктор медицинских наук

Аутеншлюс Александр Исаевич
Фурсов Сергей Александрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Трунов Александр Николаевич**
(Научный центр клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск, руководитель лаборатории иммунологии репродукции)

доктор медицинских наук, профессор **Цырендоржиев Дондок Дамдинович**
(Научно-исследовательский институт клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологии стволовой клетки)

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Барнаул)

Защита состоится «___» _____ 2013 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.05, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52)

Автореферат разослан «___» _____ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

А.В. Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Известно, что организм человека обладает способностью продуцировать факторы, обеспечивающие инициацию, рост и прогрессию опухоли, к которым относятся и цитокины, продуцируемые различными клетками и, в первую очередь, клетками крови (O'Connor P.M. et al., 2010; Potter J.D., 1999; Рахимова О.Ю., Александров В.Б., 2008). Следовательно, оценка цитокинпродуцирующей функции клеток, опосредующих взаимодействие организма хозяина и злокачественного новообразования, в том числе спорадического рака колоректальной зоны, на долю которого приходится 94 % – 96 % всех случаев КРР и который возникает на фоне хронического воспаления, является актуальной, так как позволит понять роль цитокинов в процессах адаптации опухоли в организме и поможет на этой основе разработать критерии тяжести опухолевого роста в предоперационном периоде (Burstein E. et al., 2008).

Цель исследования. Оценить цитокинпродуцирующий потенциал клеток, уровни цитокинов сыворотки крови и факторы регуляции биологических эффектов цитокинов у больных колоректальным раком.

Задачи исследования:

1. Определить цитокинпродуцирующий потенциал клеток крови в супернатантах моно- и полиморфноядерных клеток крови, стимулированных поликлональными активаторами при аденокарциномах толстой кишки по концентрации в них цитокинов IL-1 β , IL-1Ra, TNF α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IFN γ , MCP-1 и связывающего IL-18 белка – IL-18BP, являющегося регулятором биологических эффектов IL-18.

2. Определить концентрацию цитокинов IL-1 β , IL-1Ra, TNF α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IFN γ , MCP-1, VEGF и связывающего IL-18 белка – IL-18BP в сыворотке крови больных колоректальным раком.

3. Определить уровни аутоантител классов G, M, A и субклассов G1, G2, G3, G4 к TNF α в качестве регуляторов его биологических эффектов в сыворотке крови больных колоректальным раком.

4. Определить в опухоли относительное содержание клеток с маркером пролиферации – Ki-67 и патогистологические параметры аденокарцином у больных колоректальным раком, изучить сопряженность показателей цитокинпродуцирующей функции клеток крови, уровней цитокинов сыворотки крови и регуляторов биологических эффектов цитокинов с пролиферативной активностью и патогистологическими параметрами опухолей.

Научная новизна исследования. Впервые выявлена обратная корреляционная связь между ИВПА на продукцию клетками крови IL-1Ra, количеством митозов и степенью васкуляризации опухоли, между ИВПА на продукцию клетками крови TNF α и относительным содержанием в опухоли высокодифференцированных клеток, прямая – между ИВПА на продукцию клетками крови IL-8 и глубиной инвазии опухоли.

Впервые показано, что ИВПА на продукцию клетками крови IL-17 был сопряжен с наибольшим количеством патогистологических параметров опухоли: находился в обратной корреляционной связи с выраженностью инфильтрации опухоли гранулоцитами, количеством митозов в поле зрения, содержанием низкодифференцированных клеток в опухоли, глубиной инвазии и степенью злокачественности.

Впервые было установлено, что ИВПА на продукцию клетками крови IL-8 больных КРР, в тех случаях, когда опухоль прорастала все слои стенки кишки, превышал соответствующий показатель здоровых, в отличие от тех больных, у которых инвазия опухоли не достигала серозной оболочки.

Впервые установлено, что у больных КРР по сравнению со здоровыми лицами повышены уровни АТ класса А и субкласса G4 к TNF α и снижены уровни АТ класса М к TNF α . Обнаружены обратные корреляционные связи между уровнем АТ класса М к TNF α и количеством низкодифференцированных клеток в опухоли и прямая – с содержанием высокодифференцированных клеток в опухоли. Процент Ki-67-позитивных клеток опухолей находился в обратной корреляционной связи со способностью клеток периферической крови продуцировать IL-2 и IFN γ .

Впервые показано, что концентрация IL-1Ra, IL-6, IL-18 в сыворотке крови больных КРР была более высокой по сравнению со здоровыми лицами, а уровень IL-18 находился в прямой корреляционной связи с выраженностью инфильтрации опухоли лимфоцитами.

Теоретическое и практическое значение. Полученные данные о цитокинпродуцирующем потенциале клеток крови, уровнях цитокинов в сыворотке крови и факторах регуляции биологических эффектов цитокинов у больных колоректальным раком создают основу для разработки новых подходов в диагностике и прогнозировании опухолевой прогрессии, в частности, показатели ИВПА на продукцию клетками крови IL-1Ra, IL-8, TNF α , IL-17, уровни АТ класса М к TNF α , концентрация в сыворотке крови IL-1Ra, IL-6 и IL-18 могут быть использованы в качестве критериев тяжести опухолевого роста в предоперационном периоде.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в учебный процесс и научную работу кафедры онкологии Новосибирского государственного медицинского университета, в практику Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики СО РАМН (г. Новосибирск). Благодаря применению стандартизованных наборов реагентов для культивирования и поликлональной активации клеток и определения цитокинов в супернатантах клеток цельной крови появилась возможность сравнивать результаты изучения цитокинпродуцирующей функции клеток, полученные в различных лабораториях.

Положения, выносимые на защиту

1. При колоректальном раке происходит модуляция цитокинпродуцирующей функции моно- и полиморфноядерных клеток крови, заключающаяся в смещении баланса в сторону проопухолевых цитокинов, а также нарастание их концентрации в сыворотке крови, сопряженных с более высокой степенью злокачественности опухоли.

2. При колоректальном раке происходит усиление гуморальной регуляции аутоантителами биологических эффектов TNF α , цитокина,

супрессирующего дифференцировку клеток, что способствует опухолевой прогрессии.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены и обсуждены на Российской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 30-летию НИИ онкологии СО РАМН «Современная онкология: достижения и перспективы развития» (Томск, 2009), на XI Международном конгрессе «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» (Москва, 2011), на Национальной конференции «Клиническая иммунология и аллергология – практическому здравоохранению» (Москва, 2012), на семинаре ФГБУ «НИИ молекулярной биологии и биофизики» СО РАМН (Новосибирск, 2012).

Публикации. Всего по теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 2 статьи – в научных рецензируемых журналах и изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России для публикаций основных результатов исследования.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, описания собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка используемой литературы. Работа иллюстрирована 6 рисунками и 8 таблицами. Указатель использованной литературы содержит 302 источника, из которых 29 отечественных и 273 иностранных.

Личный вклад автора. Основная часть материала, представленная в диссертации, получена и проанализирована лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено комитетом по этике Новосибирского государственного медицинского университета. Объект исследования: периферическая кровь 67 больных с аденокарциномами толстой кишки, взятая у них до оперативного вмешательства, и 43 условно здоровых лиц без злокачественных новообразований в анамнезе и без обострения хронических

инфекционно-воспалительных заболеваний, из которых женщин было 29 (67 %) в возрасте от 37 до 70 лет и мужчин 14 (33 %) в возрасте от 38 до 71 года (контрольная группа). Средний возраст пациентов составил $(64,5 \pm 1,3)$ года, средний возраст доноров $(52,5 \pm 1,7)$ года. Для оценки стадии опухолевого процесса использовалась международная классификация TNM (6-е издание) 2002 года. Из всех исследуемых пациентов 20 имели I стадию, в том числе у 5 – T1N0M0 (7,5 %), у 15 – T2N0M0 (22,4 %). 26 больных имели IIb стадию – T4N0M0 (38,8 %). У 20 пациентов установлена III стадия заболевания: в одном случае IIIa стадия – T2N1M0 (1,49 %), у 2 – IIIb стадия T2N2M0 (2,98 %), у 13 – T4N1M0 (19,4 %), у 4 пациентов диагностирована IIIc стадия T4N2M0 (5,94 %). В одном случае у больного KPP была выставлена IV стадия – T4N2M1 (1,49 %).

Обследованные больные находились на лечении в хирургических отделениях Новосибирского областного онкологического диспансера и в Городской клинической больнице № 1 г. Новосибирска. Все пациенты дали письменное согласие на участие в проводимом исследовании. Формы согласия и информации для пациента были разработаны этическим комитетом Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики (г. Новосибирск).

Определение цитокинпродуцирующего потенциала моно- и полиморфноядерных клеток крови с использованием поликлонального активатора, в состав которого входят ФГА в концентрации 4 мкг/мл, КонА в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарид в концентрации 2 мкг/мл, проводили с помощью стандартизованного набора «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ» производства ЗАО «Вектор-Бест».

В сыворотке крови и в супернатантах клеток крови определяли концентрацию IL-1 β , IL-1Ra, TNF α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, MCP-1, VEGF и IFN γ с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест». Определение содержания, связывающего IL-18 белка – IL-18BP, проводили с помощью набора фирмы R&D Systems. Индекс влияния поликлональных

активаторов (ИВПА) на продукцию цитокинов клетками крови высчитывали по формуле: $ИВПА = A/B$, где А – уровень стимулированной поликлональными активаторами продукции цитокина, В – уровень спонтанной продукции цитокина [Останин А.А., Черных Е.Р., 2005]. Учитывали только цитокины в сыворотке и в супернатантах клеток крови, уровни которых превышали нижний предел чувствительности используемых наборов реагентов.

Определение аутоантител классов G, M, A и субклассов G1, G2, G3, G4 к TNF α проводили с помощью иммуноферментного анализа по технологии, разработанной в лаборатории физико-химической индикации иммунных процессов Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики (г. Новосибирск), с соблюдением всех необходимых технологических приемов [Аутеншлюс А.И. и др., 2003]. Значения уровней аутоантител определяли по коэффициенту (K), который представлял собой отношение оптической плотности продукта реакции опытной сыворотки к оптической плотности продукта реакции контрольной сыворотки, представляющей собой лабораторный пул образцов здоровых лиц и выражался в условных единицах. Цитокинпродуцирующий потенциал клеток крови и иммуногистохимическое исследование срезов выполняли на резецированных опухолях у 31 больного КРР, из которых 3 имели I стадию – T2N0M0 и 3 – T1N0M0, 13 пациентов имели IIb стадию – T4N0M0, 10 IIIb стадию – T4N1M0, 1 IIIc стадию – T4N2M0 и 1 – T2N2M0. Антитела к TNF α определяли в сыворотке крови 35 больных КРР, из них у 14 была I стадия – T2N0M0 и у 2 пациентов – T1N0M0, у 8 IIb стадия – T4N0M0, у 1 IIIa стадия – T2N1M0, у 6 IIIb стадия – T4N1M0, у 3 IIIc стадия – T4N2M0 и у 1 – T2N2M0.

Патогистологическая картина препаратов, окрашенных по стандартной методике гематоксилином и эозином, характеризовалась следующими признаками, которым была дана балльная оценка: количеством опухолевых клеток в сосудах, выраженностью инфильтрации опухоли лимфоцитами, макрофагами и гранулоцитами, количеством митозов и патологических митозов в поле зрения, содержанием клеточных элементов различной степени

дифференцировки по Г.Г. Автандилову [1990], вариантом гистологической дифференцировки опухоли (низко-, умеренно- и высокодифференцированная аденокарцинома), глубиной инвазии, степенью васкуляризации и количеством регионарных лимфоузлов, пораженных метастазами.

Система балльной оценки патогистологической картины была первоначально разработана сотрудниками Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики (г. Новосибирск): для рака молочной железы – с участием профессора кафедры патологической анатомии, д. м. н. Т.А. Агеевой; для опухолей ЖКТ – впоследствии дополнена и расширена к.м.н. Д.В. Морозовым, которым автор выражает свою благодарность. Непосредственно изучение патогистологических параметров проводилась врачами патологоанатомами к.м.н. Д.В. Морозовым и Н.В. Агаариной, которым автор также выражает свою благодарность.

Иммуногистохимическое исследование срезов выполняли на резецированных опухолях 31 пациента с применением моноклональных кроличьих антител к Ki-67 (Clone SP6, Cat. № CRM 325 A,B,C BIOCARE MEDICAL, USA) в разведении 1 : 100 (Peña L.L. et al., 1998).

Оценка экспрессии Ki-67 осуществляли путем подсчета процента окрашенных ядер на 1000 клеток при увеличении $\times 40$ в 10 полях зрения (Клинышкова Т.В. и др., 2010). При окрашивании менее 20% опухолевых клеток пролиферативную активность считали низкой, при экспрессии Ki-67 более чем в 20 % клеток опухоли – высокой.

Особую благодарность выражаю сотрудникам лаборатории физико-химической индикации иммунных процессов: ведущему научному сотруднику к. м. н. Сосниной А.В. и старшему научному сотруднику Михайловой Е.С.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием методов непараметрического анализа. Сравнение изучаемых показателей проводили с помощью критерия Манна-Уитни для двух независимых выборок и критериев Крускала-Уоллиса и Данна для более, чем двух, независимых выборок, поэтому показатели выражены в виде медиан – Me и процентилей – 25 и 75.

Результаты исследования, в том числе и количество наблюдений (n), представлены в таблицах. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (Реброва О.Ю., 2002). Для выявления взаимосвязи переменных проводили расчет коэффициента ранговой корреляции по Спирмену (r). Для статистической обработки данных применяли программу Statistica 6.0. Критерий Данна вычисляли по соответствующей формуле (Гланц С., 1999) с использованием программы Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние поликлональных активаторов на цитокинпродуцирующую функцию клеток крови и его взаимосвязь с патогистологическими параметрами опухоли у больных колоректальным раком. Исследование показало, что цитокинпродуцирующая функция клеток крови больных КРР либо не изменялась, либо снижалась по сравнению со здоровыми лицами. Последнее касалось способности клеток продуцировать IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-17, IL-18 и IFN γ под влиянием поликлональных активаторов.

Изучение сопряженности между цитокинпродуцирующей функцией клеток крови и патогистологическими параметрами аденокарцином толстой кишки показало наличие обратной корреляционной связи между ИВПА на продукцию клетками крови IL-1Ra и количеством митозов в поле зрения, а также степенью васкуляризации опухоли, что позволяет предположить увеличение пролиферативной активности опухолевых клеток и усиление ангиогенеза, при снижении способности клеток крови продуцировать IL-1Ra. А с учетом корреляционных связей между патогистологическими параметрами, можно заключить, что снижение продукции клетками IL-1Ra опосредованно сопряжено с большей степенью тяжести опухолевой прогрессии.

ИВПА на продукцию клетками крови IL-8 находился в прямой корреляционной связи с глубиной инвазии, то есть, прогрессирование злокачественного новообразования было связано с возрастанием способности клеток крови продуцировать этот цитокин. Экспрессия рецепторов к IL-8 на клетках опухоли, эндотелиальных клетках, нейтрофилах и

опухолеассоциированных макрофагов свидетельствует, по данным литературы, о том, что повышенная секреция этого цитокина оказывает влияние на микроокружение опухоли (Brat D.J. et al., 2005), усиливая их пролиферацию, супрессируя апоптоз и продукцию ими матриксных металлопротеиназ MMPs, что, в конечном счете, стимулирует ангиогенез опухоли (Li A. et al., 2003).

Обратная корреляционная связь была выявлена и между ИВПА на продукцию $\text{TNF}\alpha$ и относительным содержанием в опухоли высокодифференцированных клеток, что свидетельствовало о том, что при менее дифференцированных опухолях, и, следовательно, большей степени тяжести опухолевой прогрессии, а об этом можно судить и по обратной корреляционной связи между относительным содержанием высокодифференцированных клеток в опухоли и глубиной инвазии, возрастает функциональная активность $\text{TNF}\alpha$ -продуцирующих клеток.

ИВПА на продукцию клетками крови IL-17 был сопряжен с наибольшим количеством патогистологических параметров опухоли, находясь в обратной корреляционной связи с выраженностью инфильтрации опухоли гранулоцитами, количеством митозов в поле зрения, содержанием низкодифференцированных клеток в опухоли, глубиной инвазии и степенью злокачественности. Оказалось, что при значении ИВПА IL-17, равном 4 и более, в 89 % случаев содержание низкодифференцированных клеток в опухоли было менее 10 %, а у 11 % больных оно составило 10 % и более. При значениях ИВПА IL-17 ниже 4 содержание низкодифференцированных клеток менее 10 % наблюдалось у 25 % больных, а 10 % и более – у 75 % ($p = 0,003$). При ИВПА IL-17 ниже 10 во всех случаях аденокарциномы были низко – и умереннодифференцированными, а при ИВПА IL-17, равном 10 и более, в 75 % случаев аденокарциномы были высокодифференцированными ($p = 0,001$). Кроме того, при величине ИВПА на продукцию клетками крови IL-17 не ниже 10 в 100 % случаев опухоль прорастала не глубже мышечного слоя, а при величине ИВПА ниже 10 во всех случаях опухоль прорастала все слои стенки кишки. То есть, большая степень тяжести опухолевой прогрессии связана с

угнетением продукции клетками крови IL-17, который, согласно результатам экспериментальных исследований, проявляет способность ингибировать опухолевый рост [Benchetrit F. et al., 2002].

Обнаружены корреляционные связи между ИВПА на продукцию клетками крови IL-8 и TNF α и патогистологическими параметрами опухоли (глубиной инвазии и относительным содержанием высокодифференцированных клеток в опухоли, соответственно), обусловили необходимость сравнения величин ИВПА на продукцию клетками крови IL-8 у больных КРР, разделенных на подгруппы, в зависимости от глубины инвазии, и ИВПА на продукцию TNF α у больных, разделенных на подгруппы, в зависимости от относительного содержания высокодифференцированных клеток в опухоли, с соответствующими показателями здоровых лиц. Было установлено, что ИВПА на продукцию клетками крови IL-8 больных КРР в тех случаях, когда опухоль прорастала все слои стенки кишки, статистически значимо превышал соответствующий показатель здоровых, в отличие от тех больных, у которых инвазия опухоли не достигала серозной оболочки.

У больных КРР при содержании в опухоли высокодифференцированных клеток, не превышающем 20 %, ИВПА на продукцию клетками крови TNF α также был статистически значимо более высоким по сравнению со здоровыми, в отличие от больных, в опухолях которых содержание высокодифференцированных клеток составило более 20 %. Следовательно, среди больных аденокарциномами толстой кишки встречаются лица с повышенной способностью клеток крови к продукции IL-8 и TNF α , которые характеризуются большей степенью тяжести опухолевой прогрессии.

Что касается взаимосвязи между пролиферативной активностью опухолевых клеток и цитокинпродуцирующей функцией клеток крови, то показатель способности последних продуцировать IL-2 и IFN γ в ответ на стимуляцию ПА, оцениваемый по ИВПА, находился в обратной корреляционной связи с относительным содержанием Ki-67-позитивных клеток ($r = -0,52$, $p = 0,003$ и $r = -0,43$, $p = 0,02$, соответственно), то есть, с увеличением

степени тяжести опухолевой прогрессии происходит угнетение способности клеток крови к продукции цитокинов, обладающих рядом противоопухолевых эффектов.

Таким образом, изучение цитокинпродуцирующей функции клеток крови при аденокарциномах толстой кишки показало селективную супрессию способности клеток крови продуцировать цитокины – IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-17, IL-18 и IFN γ под влиянием поликлональных активаторов на фоне статистически не отличающейся от здоровых лиц продукции IL-6, IL-10 и MCP-1, а также связывающего IL-18 белка – IL-18BP.

Было установлено, что угнетение цитокинпродуцирующей функции клеток крови усугубляется с увеличением степени тяжести опухолевой прогрессии. Это касается продукции IL-1Ra и IL-17. Тем не менее, у ряда больных с большей степенью тяжести опухолевой прогрессии наблюдалось повышение продукции IL-8 и TNF α , источником которых являются преимущественно клетки моноцитарного ряда. Такое избирательное повышение функциональной активности этих клеток связано с тем, что опухоль и ее микроокружение, помимо факторов, вызывающих иммуносупрессию, продуцирует и провоспалительные цитокины, оказывающие стимулирующее влияние на лейкоциты периферической крови (Yan L., 2006). Проведенное исследование показало, что только по значению индекса влияния поликлональных активаторов на продукцию клетками крови IL-17 можно с высокой степенью вероятности еще до операции судить о глубине инвазии опухоли, являющейся одним из наиболее существенных патогистологических параметров, интересующих клиницистов.

Концентрация цитокинов и IL-18BP в сыворотке крови и их взаимосвязь с патогистологическими параметрами опухоли у больных колоректальным раком. Исследование показало, что уровни IL-1Ra, IL-6, IL-18 в сыворотке крови больных КРР было статистически значимо более высоким по сравнению со здоровыми лицами. Среди этих цитокинов необходимо выделить IL-1Ra, 25 перцентиль (400 пг/мл) содержания которого

был выше 75 процентиля (346 пг/мл) его содержания в сыворотке крови здоровых лиц, что дает основание считать уровни IL-1Ra от 400 пг/мл и выше присущими аденокарциномам толстой кишки. Повышенный уровень IL-1Ra может свидетельствовать о противоопухолевой активности иммунокомпетентных клеток хозяина, так как макрофаги микроокружения и клетки опухоли способны синтезировать IL-1, который способствует опухолевой прогрессии за счет индукции экспрессии VEGF, увеличению инвазивности и метастазирования злокачественного новообразования (Chen H. et al., 2009). Возможно, что повышенная секреция IL-1Ra позволяет неоплазме поддерживать воспаление на уровне, необходимом ей для создания оптимальных условий жизнедеятельности, а также ингибировать чрезмерно выраженную воспалительную реакцию, которая может привести к деструкции опухолевой ткани.

Что касается IL-6, то его участие в канцерогенезе неоднозначно. С одной стороны этот цитокин повышает экспрессию раково-эмбрионального антигена и МНС I класса на поверхности опухолевых клеток, что увеличивает вероятность их распознавания иммунокомпетентными клетками (Ullmann C.D. et al., 1992), а с другой – стимулирует пролиферативную активность опухоли, предотвращает апоптоз и способствует синтезу VEGF (Ochoa C.E. et al., 2011).

Концентрация MCP-1 в сыворотке крови больных КРР была взаимосвязана с количеством патологических митозов в опухоли ($r = 0,422$; $p = 0,018$), которое, в свою очередь, сопряжено с глубиной инвазии, что свидетельствует о том, что уровень MCP-1 отражает степень тяжести опухолевого процесса. Отмечено, что MCP-1 увеличивает пролиферацию, супрессирует дифференцировку и апоптоз клеток опухоли через активацию протеинкиназ MAPK (Jiménez-Sainz M.C. et al., 2003). Этот цитокин, секретируемый опухолью и инфильтрирующими ее лейкоцитами, стимулирует миграцию в очаг опухолевого роста макрофагов, которые, в свою очередь, являются источником таких цитокинов, как IL-8 и TNF α , которые, обладая мощным ангиогенным действием, обеспечивают полноценное

функционирование опухоли, что, в конечном счете, приводит к метастазированию [Solinas G. et al., 2009; Mantovani A. et al., 2004].

Было установлено, что из всех изученных цитокинов, только уровень IL-18 одновременно превышал аналогичные показатели здоровых лиц и был взаимосвязан с патогистологическими параметрами опухолей. Уровень IL-18 был сопряжен только с инфильтрацией опухоли лимфоцитами, которая, в свою очередь, находилась в прямой корреляционной связи с глубиной инвазии опухоли ($r = 0,352$; $p = 0,048$) и количеством пораженных метастазами лимфоузлов ($r = 0,541$; $p = 0,002$). То есть уровень этого цитокина отражает степень тяжести опухолевой прогрессии. Это подтверждается сведениями о том, что IL-18 может стимулировать прогрессию злокачественного новообразования посредством различных механизмов (Park S. et al., 2007).

Уровни аутоантител к TNF α в сыворотке крови и их взаимосвязь с патогистологическими параметрами опухоли у больных колоректальным раком. Изучение уровней аутоантител к цитокинам показало, что у больных КРР по сравнению со здоровыми лицами повышены уровни АТ класса А и субкласса G4 к TNF α и снижены уровни АТ класса М к TNF α .

Были выявлены корреляционные связи между уровнями АТ к TNF α и патогистологическими параметрами опухолей, которые можно объяснить, исходя из известных биологических эффектов соответствующих цитокинов. Поэтому сопряженность уровней АТ класса М к TNF α с содержанием НД и ВД клеток в опухоли связана с тем, что TNF α может ингибировать дифференцировку клеток, а АТ к нему – блокировать такое действие (Hyzdalova M., 2008; Zins K., 2007).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствовали о смещении баланса продукции противо- и провоспалительных цитокинов в сторону последних, что по своей сути направлено на поддержание жизнедеятельности и прогрессирования новообразования.

ВЫВОДЫ

1. С увеличением степени тяжести опухолевой прогрессии при

колоректальном раке снижается способность клеток периферической крови под влиянием поликлональных активаторов продуцировать IL-1Ra и IL-17 и повышается способность продуцировать IL-8 и TNF α , обладающих широким спектром проопухолевых эффектов, то есть при прогрессировании злокачественного новообразования происходит модуляция цитокинпродуцирующей функции клеток.

2. Концентрация IL-18 в сыворотке крови находилась в прямой корреляционной связи с выраженностью инфильтрации опухоли лимфоцитами, которая, в свою очередь, была сопряжена с глубиной инвазии опухоли и количеством лимфоузлов, пораженных метастазами, что опосредованно отражало степень тяжести опухолевой прогрессии при колоректальном раке.

3. Концентрация MCP-1 в сыворотке крови больных колоректальным раком находилась в прямой корреляционной связи с количеством патологических митозов в опухоли, которое, в свою очередь, было сопряжено с глубиной инвазии и свидетельствовало о том, что уровень MCP-1 через цепь каскадов обеспечивает опухолевую прогрессию.

4. По мере увеличения пролиферативной активности опухолевых клеток, о чем можно судить по возрастанию относительного содержания Ki-67 позитивных клеток, снижается способность клеток крови под влиянием поликлональных активаторов продуцировать IL-2 и IFN γ , что отражает селективную супрессию продукции цитокинов, обеспечивающих резистентность организма при возникновении клеточной атипии.

5. У больных колоректальным раком повышены уровни антител класса A и субкласса G4 к TNF α и снижены уровни АТ класса М к TNF α в сыворотке крови по сравнению со здоровыми лицами. Уровни АТ класса М к TNF α находились в прямой корреляционной связи с количеством высокодифференцированных клеток в опухоли и в обратной – с количеством низкодифференцированных, что свидетельствовало о том, что АТ класса М к TNF α являются факторами, регулирующими эффекты TNF α , в частности его способность ингибировать дифференцировку клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Провоспалительные цитокины и регуляторы их активности у больных раком желудочно-кишечного тракта / А.И. Аутеншлюс, А.В. Соснина, Е.С. Михайлова, А.П. Лыков, Д.В. Морозов, **Н.В. Великая**, С.А. Фурсов, Н.А. Вараксин // **Цитокины и воспаление**. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 18-22, автора – 0,08 п.л.

2. Цитокинпродуцирующая функция клеток периферической крови у больных колоректальным раком / А.В. Соснина, А.И. Аутеншлюс, **Н.В. Великая**, Н.А. Вараксин, М.Ю. Рукавишников, Е.С. Михайлова, Д.В. Морозов, С.А. Фурсов, Н.В. Агарина // **Медицинская иммунология**. – 2011 – Т.13, № 2-3. – С.197-204, автора – 0,11 п.л.

3. Функциональная активность клеток периферической крови при раке желудочно-кишечного тракта / А.В. Соснина, А.П. Лыков, А.И. Аутеншлюс, Е.С. Михайлова, **Н.В. Великая**, С.А. Фурсов, Н.А. Вараксин // Современная онкология: достижения и перспективы развития : материалы Российской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 30-летию НИИ онкологии СО РАМН, 10-11 сентября 2009 г. Томск // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Приложение № 2. – С. 182-183, автора – 0,04 п.л.

4. Оценка цитокинпродуцирующей функции клеток крови и пролиферативной активности опухолевых клеток при раке толстой кишки / А.И. Аутеншлюс, А.В. Соснина, **Н.В. Великая**, С.А. Фурсов, Е.С. Михайлова, Н.Б. Исакова, Д.В. Морозов, А.П. Лыков, Н.А. Вараксин // Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии : труды XI Международного конгресса, 5-8 июля 2011 г., Москва // Российский аллергологический журнал. – 2011. – № 4, выпуск 1. – С.34-35, автора – 0,03 п.л.

5. Могут ли уровни цитокинов сыворотки крови служить маркерами опухолевой прогрессии при аденокарциномах толстой кишки? / А.В. Соснина, А.И. Аутеншлюс, **Н.В. Великая**, С.А. Фурсов, Е.С. Михайлова, Д.В. Морозов, Н.А. Вараксин, М.Ю. Рукавишников // Современные проблемы иммунологии,

аллергологии и иммунофармакологии : труды XI Международного конгресса, 5-8 июля 2011 г., Москва // Российский аллергологический журнал. – 2011. – № 4, выпуск 1. – С.354-355, автора – 0,03 п.л.

6. Цитокинпродуцирующий потенциал клеток крови больных с аденокарциномами желудка и толстой кишки в предоперационный период / А.В. Ванхальский, **Н.В. Великая**, Е.С. Михайлова, А.П. Лыков, Д.В. Морозов, Н.А. Вараксин, С.А. Фурсов, А.В. Соснина, А.И. Аутеншлюс // Клиническая иммунология и аллергология – практическому здравоохранению : труды Национальной конференции, 20-21 февраля 2012 г., Москва // Российский аллергологический журнал.– 2012. – № 1, выпуск 1. – С.70-71, автора – 0,03 п.л.

7. Антитела к TNF α и IFN γ при аденокарциномах желудочно-кишечного тракта / **Н.В. Великая**, А.В. Ванхальский, Е.С. Михайлова, Д.В. Морозов, Н.А. Вараксин, С.А. Фурсов, А.В. Соснина, А.И. Аутеншлюс // Клиническая иммунология и аллергология – практическому здравоохранению : труды Национальной конференции 20-21 февраля 2012 г., Москва // Российский аллергологический журнал. – 2012.– № 1, выпуск 1. – С.73-74, автора – 0,03 п.л.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КРР	колоректальный рак
ВД	высокодифференцированные клетки
ИБПА	индекс влияния поликлональных активаторов
КРР	колоректальный рак
НД	низкодифференцированные клетки
УД	умереннодифференцированные клетки
ФГА	фитогемагглютинин
Кона	конканавалин А
IL-18BP (IL-18 bindingprotein)	белок, связывающий интерлейкин-18
IL-1Ra	рецепторный антагонист интерлейкина-1
MCP	моноцитарный хемотаксический протеин
TGF- β	трансформирующий ростовой фактор β
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов