

# ПАРАМЕТРЫ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ И ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Селихова Ю.Б.<sup>1</sup>, Останина И.Б.<sup>2</sup>, Старостина Н.М.<sup>1</sup>,  
Сидоров С.В.<sup>2</sup>, Меняева Е.В.<sup>1</sup>, Кожевников В.С.<sup>1</sup>,  
Черных Е.Р.<sup>1</sup>, Останин А.А.<sup>1</sup>, Козлов В.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН

<sup>2</sup> Муниципальная городская клиническая больница № 1, г. Новосибирск

**Резюме.** Настоящая работа посвящена анализу параметров иммунитета у больных раком молочной железы (РМЖ) на промежуточном этапе комплексной противоопухолевой терапии. В исследование были включены 50 женщин с РМЖ II и III стадии (T<sub>2-3</sub>, N<sub>0-3</sub>, M<sub>0</sub>). После проведенной лучевой терапии и хирургического лечения до начала полихимиотерапии у больных оценивали клеточный состав периферической крови и уровень продукции цитокинов (IL-1β, IL-5, IL-7, IL-12 (p 70), IL-13, IL-17, G-CSF, MCP-1, MIP-1β). Было выявлено достоверное снижение общего количества лимфоцитов, CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>T-клеток, CD19<sup>+</sup>B-клеток, эритроцитов, уровня гемоглобина, а также количества фагоцитирующих клеток. Цитокиновый статус характеризовался преобладанием продукции провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-12, IL-17) и хемокинов (MCP-1, MIP-1β) в сочетании с низким уровнем Th2/противовоспалительного IL-13. Кроме того, было выявлено статически значимое увеличение продукции факторов гемоиммунопозза (G-CSF, IL-7), что может свидетельствовать о включении компенсаторных механизмов в ответ на цитотоксические эффекты проводимой противоопухолевой терапии. Важно отметить, что продукция IL-7 у больных с лимфопенией (< 1,2x10<sup>9</sup>/л; 0,81±0,11) была достоверно выше, чем в оппозитной группе женщин без лимфопении (> 1,2x10<sup>9</sup>/л; 1,34±0,01). Обратная корреляционная взаимосвязь (r<sub>s</sub> = -0,88; p < 0,0001) между количеством лимфоцитов и уровнем IL-7 позволяет предположить, что восстановление пула циркулирующих T-клеток у больных РМЖ происходит через механизм гомеостатической периферической экспансии. Обсуждается возможная роль данного механизма в формировании протективного противоопухолевого иммунитета, а также в отношении риска развития аутоиммунных реакций.

*Ключевые слова:* рак молочной железы, цитокины, IL-7, лимфопения.

Selikhova Yu.B., Ostanina I.B., Starostina N.M., Sidorov S.V., Menyayeva E.V., Kozhevnikov V.S., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Kozlov V.A.

## IMMUNE PARAMETERS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER AFTER RADIOTHERAPY AND SURGICAL TREATMENT

**Abstract.** Some immune parameters (cell subsets in peripheral blood, spontaneous and LPS-induced production of IL-1β, IL-5, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, MCP-1 and MIP-1β in whole blood cultures) were studied in fifty patients with breast cancer (T<sub>2-3</sub>, N<sub>0-3</sub>, M<sub>0</sub>) after radiation therapy and surgical treatment. A significant decrease in lymphocytes, CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>T-cell counts, CD19<sup>+</sup>B-lymphocytes, erythrocytes, hemoglobin level, and amounts of phagocytic cells was revealed. The cytokine status was characterized by prevalence of pro-inflammatory cytokines

### Адрес для переписки:

Селихова Юлия Борисовна  
НИИ клинической иммунологии СО РАМН,  
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: (383) 228-28-57.  
Факс: (383) 222-70-28.  
E-mail: vid\_ici @ ngs.ru

(IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17) and chemokines (MCP-1, MIP-1 $\beta$ ), accompanied by low levels of Th2/anti-inflammatory IL-13. Furthermore, a markedly increased production of G-CSF and IL-7 was found, thus apparently pointing to the switching of a compensatory mechanisms in response to cytoreductive effects of anti-tumor therapy. IL-7 levels in lymphopenic patients ( $< 1.2 \times 10^9/L$ ; a mean of  $0.81 \pm 0.11$ ) were significantly higher than that in an opposite group of lymphopenia-free women ( $> 1.2 \times 10^9/L$ ; a mean of  $1.34 \pm 0.01$ ). An inverse correlation ( $r_s = -0,88$ ;  $p < 0,0001$ ) between blood lymphocyte counts and IL-7 levels allows us to suggest a mechanism of homeostatic peripheral expansion (HPE) to be involved in maintenance and restoration of T cell homeostasis in the patients treated for breast cancer. Significance of HPE mechanism for induction of both beneficial protective tumor-specific autoimmunity and increased risk of autoimmune complications is discussed. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 419-428)

По данным медицинской статистики, патологические процессы молочной железы в общей структуре заболеваний женщин выявляются с частотой 13,5-30%. При этом в большинстве стран отмечается рост заболеваемости раком молочной железы (РМЖ). Так, по данным ВОЗ каждый год в мире регистрируется более 650 тысяч новых случаев РМЖ, в странах СНГ – свыше 50 тысяч. Это наиболее частая локализация рака у женщин в США, где патология развивается у каждой восьмой женщины, и в странах Европы, где заболевает каждая десятая женщина. За период 1996-2005 гг. в структуре онкологической заболеваемости населения г. Новосибирска удельный вес злокачественных новообразований молочной железы увеличился с 9,5 до 11%. В структуре смертности населения нашего города РМЖ занимает третье место (8,9%) среди всех злокачественных новообразований. Приведенные показатели заболеваемости/летальности отражают общероссийскую тенденцию по этой проблеме [2, 5].

В большинстве случаев при РМЖ проводится комбинированная противоопухолевая терапия. Объемные хирургические операции, лучевая и цитостатическая полихимиотерапия (ПХТ), к сожалению, приводят к дополнительным нарушениям функций исходно компрометированной иммунной системы [1]. Общеизвестно, что нарастающая в результате противоопухолевой терапии иммунодепрессия способствует развитию инфекционных осложнений и повышает риск рецидива/метастазирования опухоли за счет ослабления механизмов иммунного надзора. Однако следует признать, что ряд вопросов, касающихся проявлений и механизмов развития нарушений иммуногемопоеза у больных РМЖ, остается не до конца изученным. В частности не ясно, являются ли дисфункции иммунитета и кроветворения однотипными или же могут различаться в зависимости от возраста больных РМЖ, стадии заболевания, гормональной чувствительности опухолевых клеток. Какое влияние оказывает радиотерапия и хирургическое лечение на цитокин-секреторную функцию

клеток крови больных? Через какие механизмы происходит восстановление пула циркулирующих клеток после циторедуктивных воздействий противоопухолевой терапии? Отсутствие четкого понимания этих вопросов затрудняет поиск и разработку новых подходов по профилактике и коррекции иммунных нарушений, которые могли бы позволить повысить эффективность традиционной терапии и улучшить качество жизни больных РМЖ.

## Материалы и методы

В исследование были включены 50 женщин с РМЖ II и III стадий ( $T_{2-4}N_{0-3}M_0$ ) в возрасте от 32 до 68 лет (средний возраст  $52 \pm 8,2$  года). Всем пациенткам проводилась стандартная комбинированная противоопухолевая терапия, которая включала предоперационную локорегионарную дистанционную гамма-терапию, затем хирургическое лечение (радикальная мастэктомия по Маддену), и на завершающем этапе – проведение курсов ПХТ по схеме АС (доксорубин, циклофосфамид). Иммунологическое обследование было выполнено через 15-20 дней после мастэктомии (до начала ПХТ). Иммунный статус оценивали у всех пациенток. Кроме того, у 13 женщин дополнительно оценивали цитокиновый статус, и в 45 случаях определяли рецепторный статус опухолевых клеток (эстрогеновые и прогестинные рецепторы). Все исследования проводили после получения письменного информированного согласия больных и были одобрены решением Локального этического комитета ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Группу контроля составили практически здоровые доноры крови.

Общий анализ периферической крови проводили на гемоанализаторе «HEMA-Screen 13» (Швейцария-Италия). Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли методом проточной цитофлюориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) с помощью моноклональных антител против CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> и CD19<sup>+</sup> (МедБиоСпектр и Сорбент, Россия). Эффекторные функции лимфоцитов оценива-

ли в тесте гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) по интенсивности выработки ими факторов стимуляции и торможения миграции лейкоцитов в ответ на митогенную стимуляцию фитогемагглютинином-Р (Difco, США). Стимуляцию миграции клеток субоптимальной дозой митогена учитывали как индекс миграции (ИМ), ингибирование миграции оптимальной дозой митогена – как индекс ингибирования миграции (ИИМ), интегративную активность поликлональных ГЗТ-эффекторов – как показатель эффекторных функций (ПЭФ). Функциональную активность фагоцитарных клеток оценивали по показателю активации нейтрофилов (ПАН) и моноцитов (ПМ), определяемому по продукции перекиси водорода клетками после стимуляции зимозаном. Результат оценивался на многоканальном спектрофотометре (Multiskan MS, Labsystems, Финляндия) по интенсивности окрашивания пробы, которое происходило за счет окисления ортофенилдиамина в процессе катаболизма перекиси водорода. Фагоцитарную активность гранулоцитов и моноцитов оценивали также методом проточной цитометрии после инкубации выделенных клеток с латексом, меченым FITS.

Содержание в супернатантах цельной крови 9 цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-7, IL-12 (p 70), IL-13, IL-17, G-CSF, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) оценивали методом проточной флюориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (определяемый динамический диапазон 2-32 000 пкг/мл). Периферическую кровь забирали разовым шприцем из локтевой вены, добавляли в стерильную пробирку, содержащую гепарин (20 ЕД/мл), и тщательно перемешивали. Затем 1 мл цельной гепаринизированной крови смешивали с 4 мл среды RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера и 100 мкг/мл гентамицина, т.е. кровь разводили в 5 раз. Подготовленные таким образом образцы крови (по 1 мл) культивировали в круглодонных стерильных пробирках в присутствии липополисахарида (LPS, *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma, США) в конечной концентрации 10 мкг/мл, а также в отсутствие митогенной стимуляции. Культивирование проводили при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 24 ч, после чего осторожно отбирали супернатанты (аликвотами по 0,2 мл) и хранили полученные образцы при -20°C до тестирования. Уровень продукции цитокинов в цельной крови пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества мононуклеарных клеток (МНК) и выражали в пкг/мл/10<sup>6</sup> МНК.

Рецепторный статус опухолевых клеток (экспрессию эстрогеновых (RE) и прогестинных (RP) рецепторов) определяли с помощью иммуноферментного анализа. Опухоль считалась как рецептор-положительная (R+), если более 10% опухолевых клеток экспрессировали RE и/или RP. Для математической обработки полученных данных использовали программу STATISTICA 6.0 (StatSoft, США).

## Результаты и обсуждение

Исследования параметров крови, которые проводились после проведения лучевой терапии и оперативного лечения, выявили нарушения гемо- и иммунопоеза у больных РМЖ. По сравнению со здоровыми донорами (n = 50) в группе обследованных больных (n = 50) отмечалось достоверное снижение общего числа лимфоцитов (0,99±0,05 vs 1,96±0,1 x 10<sup>9</sup>/л), эритроцитов (4,0±0,1 vs 5,0±0,2 x 10<sup>12</sup>/л) и уровня гемоглобина (126±1,7 vs 146±3,3 г/л). При этом лимфопения (< 1,2 x 10<sup>9</sup>/л) регистрировалась у 72% обследованных женщин, а лабораторные проявления анемии (эритроциты < 3,9 x 10<sup>12</sup>/л и/или гемоглобин < 120 г/л) – в 64% случаев.

При исследовании параметров иммунного статуса у подавляющего большинства больных РМЖ (42/50, 84%) были выявлены лабораторные признаки вторичного иммунодефицита (табл. 1). В целом по группе обнаруживалось достоверное снижение относительного количества CD3<sup>+</sup>T-клеток и популяции CD4<sup>+</sup> T-лимфоцитов. Уменьшение доли CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>T-клеток на фоне общей лимфопении закономерно сопровождалось и снижением их абсолютного числа в среднем на 50-60% по сравнению с уровнем здоровых доноров. В этой связи интересно отметить, что абсолютное количество CD8<sup>+</sup>T-клеток у больных РМЖ также было снижено (примерно на 35%), хотя их процентное содержание было достоверно выше донорских значений (29,2±1,2 vs 24,9±0,7%, p<sub>U</sub> < 0,01).

Количественный дефицит (относительный и абсолютный) регистрировался и в отношении CD19<sup>+</sup>B-клеток и гранулоцитов/моноцитов, способных фагоцитировать FITC-меченые латексные частицы. По сравнению с донорами у больных была снижена функциональная активность моноцитов/макрофагов (ПМ). В то же время нейтрофилы сохраняли способность к эффективной продукции метаболитов кислорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в ответ на стимуляцию зимозаном. Оценка эффекторных функций лимфоцитов в тестах ГЗТ не выявила значимых отклонений от средних нормативных значений.

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ РМЖ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Показатель	Доноры (n = 50)	Больные РМЖ (n = 50)
Лимфоцитоз (x 10 <sup>9</sup> /л)	1,96±0,1	0,99±0,05**
CD3 <sup>+</sup> Т-клетки (%)	65,0±0,8	61,1±1,3**
CD3 <sup>+</sup> Т-клетки (x 10 <sup>9</sup> /л)	1,23±0,06	0,60±0,03**
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки (%)	38,9±0,8	31,3±1,2**
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки (x 10 <sup>9</sup> /л)	0,71±0,04	0,30±0,02**
CD8 <sup>+</sup> Т-клетки (%)	24,9±0,7	29,2±1,2**
CD8 <sup>+</sup> Т-клетки (x 10 <sup>9</sup> /л)	0,46±0,03	0,30±0,02**
CD4/CD8	1,7±0,1	1,3±0,1**
CD19 <sup>+</sup> В-клетки (%)	11,2±0,7	7,6±0,6**
CD19 <sup>+</sup> В-клетки (x 10 <sup>9</sup> /л)	0,22±0,01	0,07±0,005**
CD16 <sup>+</sup> NK-клетки (%)	18,9±0,8	21,9±1,3
Фаг-гранулоциты (%)	80,4±1,1	66,9±1,2**
Фаг-моноциты (%)	69,1±1,0	56,5±1,3**
ИМ (усл.ед)	1,3 ±0,1	1,2±0,1
ИИМ (усл.ед)	0,4±0,1	0,4±0,1
ПЭФ (усл.ед)	3,6±0,2	3,7±0,3
ПАМ (усл.ед)	3,3±0,2	2,2±0,1**
ПАН (усл.ед)	2,6±0,1	4,6±0,3**

**Примечание.** Данные представлены в виде M±S.E. \*\* –  $p_U < 0,01$ ; достоверность различий по сравнению с донорами (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Частотный анализ показал, что среди 42 пациенток с лабораторными проявлениями иммунодефицита комбинированные иммунные нарушения, затрагивающие несколько звеньев иммунитета, регистрировались чаще, чем изолированные расстройства (в 64% и 36% случаев соответственно). При этом, как правило, обнаруживались изменения параметров Т-клеточного и моноцитарно-макрофагального звеньев иммунитета, и относительно реже – нарушения В-звена или функции нейтрофилов. Следует отметить, однако, что у 36% пациенток наблюдалось увеличение относительного содержания CD16<sup>+</sup>NK-клеток, что в совокупности с повышенной функциональной активностью нейтрофилов (ПАН) могло свидетельствовать о включении эффекторных механизмов неспецифического (врожденного) иммунитета.

С целью выявления взаимосвязи между иммуногематологическими параметрами и клиническими особенностями опухолевого процесса все пациентки были разделены на оппозитные подгруппы по каждому из следующих признаков: наличие/отсутствие менструальной функции,

стадия заболевания (II vs III стадия), наличие/отсутствие рецепторов к эстрогенам и прогестинам в ткани опухоли (R+ vs R-). В результате было установлено, что в подгруппе пациенток с сохраненной на момент начала лечения менструальной функцией (n = 19, средний возраст 45 лет) по сравнению с женщинами в менопаузе (n = 31, средний возраст 53 года) достоверно ниже количество эритроцитов в крови (3,8±0,1 vs 4,1±0,1 x 10<sup>12</sup>/л,  $p_U = 0,02$ ), тогда как количество нейтрофилов – достоверно выше (4,2±0,4 vs 3,1±0,2 x 10<sup>9</sup>/л,  $p_U = 0,02$ ). В то же время статистически значимых различий исследуемых параметров в подгруппах женщин, различающихся по стадии заболевания (II стадия, n = 24, средний возраст 51 год vs III стадия, n = 26, средний возраст 53 года) или по экспрессии RE/RP на опухолевых клетках (R+, n = 26, средний возраст 52 года vs R-, n = 19, средний возраст 54 года) выявлено не было.

Известно, что у молодых фертильных женщин рак молочной железы имеет более агрессивное течение и менее благоприятный прогноз, чем у женщин в менопаузе [2, 5]. Сниженное количество эритроцитов периферической кро-

ви в подгруппе больных РМЖ с сохраненной менструальной функцией отчасти имеет характер постгеморрагической анемии, однако также может рассматриваться как проявление паранеопластической анемии и косвенно отражать высокую степень агрессивности течения опухолевого процесса. Более высокий уровень нейтрофилов в этой группе женщин, вероятно, является признаком повышенной неспецифической реактивности, что обусловлено, очевидно, их возрастными особенностями. Отсутствие различий параметров иммунитета в зависимости от других клинических особенностей опухолевого процесса (стадия заболевания, характер экспрессии RE/RP на клетках опухоли), по-видимому, свидетельствует о том, что иммунные нарушения, которые выявляются у больных РМЖ на промежуточном этапе комплексной противоопухолевой терапии, в большей степени связаны с ятрогенными факторами лучевой терапии и оперативного лечения, повреждающее действие которых на иммунную систему больных перекрывает и «экранирует» их возможные различия, связанные с особенностями развития самой опухоли.

Одной из важных задач исследования являлась оценка цитокин-секреторной активности клеток крови по способности продуцировать цитокины, относящиеся к различным функционально значимым группам. Использование цельной крови было продиктовано несколькими обстоятельствами. Во-первых, данный подход

не требует выделения мононуклеарных клеток, что соответственно устраняет вероятность их неспецифической активации на этапах сепарации. Во-вторых, оценка цитокин-продуцирующей функции клеток происходит в их естественном микроокружении, при котором сохраняется существующий *in vivo* баланс как различных типов клеток крови, так и гуморальных факторов. Следовательно, оценка продукции цитокинов в экспериментальных условиях максимально приближается к условиям *in vivo* [6, 32].

Из данных таблицы 2 видно, что по сравнению со здоровыми донорами у больных РМЖ регистрируется достоверное увеличение уровня спонтанной продукции факторов гемоиммунопоза (G-CSF, IL-7) и особенно хемокинов (MCP-1, MIP-1 $\beta$ ). В то же время интенсивность спонтанной продукции IL-13, относящегося к группе Th2/противовоспалительных цитокинов, практически в 5 раз ниже средних нормативных значений (соответственно,  $4,1 \pm 0,8$  и  $23 \pm 5$  пкг/мл/ $10^6$  МНК,  $p_U < 0,01$ ). В условиях митогенной стимуляции липополисахаридом отмечается достоверное усиление продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17) и G-CSF, однако значимого прироста в уровне продукции IL-7 и хемокинов в ответ на LPS-стимуляцию не происходит. Секретция IL-13 в митоген-стимулированных культурах цельной крови больных возрастает с  $4,1 \pm 0,8$  до  $12,6 \pm 2,3$  пкг/мл/ $10^6$  МНК, однако и в этом случае уровень продукции в среднем в 2 раза

ТАБЛИЦА 2. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ (n = 11) И БОЛЬНЫХ РМЖ (n = 13)

Цитокины	Уровни цитокинов, пкг/мл/ $10^6$ МНК				ИВ <sub>LPS</sub> (Median)	
	Спонтанная секреция		LPS-стимулированная секреция		Доноры	Больные
	Доноры	Больные	Доноры	Больные		
IL-1 $\beta$	57 $\pm$ 28	42 $\pm$ 9	1380 $\pm$ 230	21190 $\pm$ 9620*	38	125
IL-12	10 $\pm$ 3	18 $\pm$ 3	26 $\pm$ 6	75 $\pm$ 13*	2,1	5,1
IL-17	80 $\pm$ 34	73 $\pm$ 14	106 $\pm$ 16	303 $\pm$ 51**	1,2	3,7
IL-5	3,0 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,7	3,4 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,7	1,2	1,0
IL-13	23 $\pm$ 5	4,1 $\pm$ 0,8**	30 $\pm$ 4,6	12,6 $\pm$ 2,3**	1,7	3,4
IL-7	3,2 $\pm$ 0,5	21,3 $\pm$ 3,3**	3,4 $\pm$ 0,8	26,8 $\pm$ 3,8**	1,0	1,2
G-CSF	61 $\pm$ 9,4	247 $\pm$ 37**	3180 $\pm$ 617	6925 $\pm$ 1858*	76	14,3
MCP-1	590 $\pm$ 271	22685 $\pm$ 5580**	1655 $\pm$ 729	12092 $\pm$ 2037**	3,3	0,6
MIP-1 $\beta$	1187 $\pm$ 221	116170 $\pm$ 13701**	1827 $\pm$ 346	115530 $\pm$ 19505**	1,0	1,0

**Примечания.** Данные представлены в виде средних ( $\pm$ S.E.) и медианных значений. \* –  $p_U < 0,05$ ; \*\* –  $p_U < 0,01$ ; достоверность различий по сравнению с группой доноров (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). ИВ<sub>LPS</sub> – индекс влияния LPS, который определялся как отношение уровня стимулированной продукции цитокинов к уровню их спонтанной секреции.

ниже, чем у здоровых доноров ( $30 \pm 4,6$  пкг/мл/ $10^6$  МНК,  $p_U < 0,01$ ).

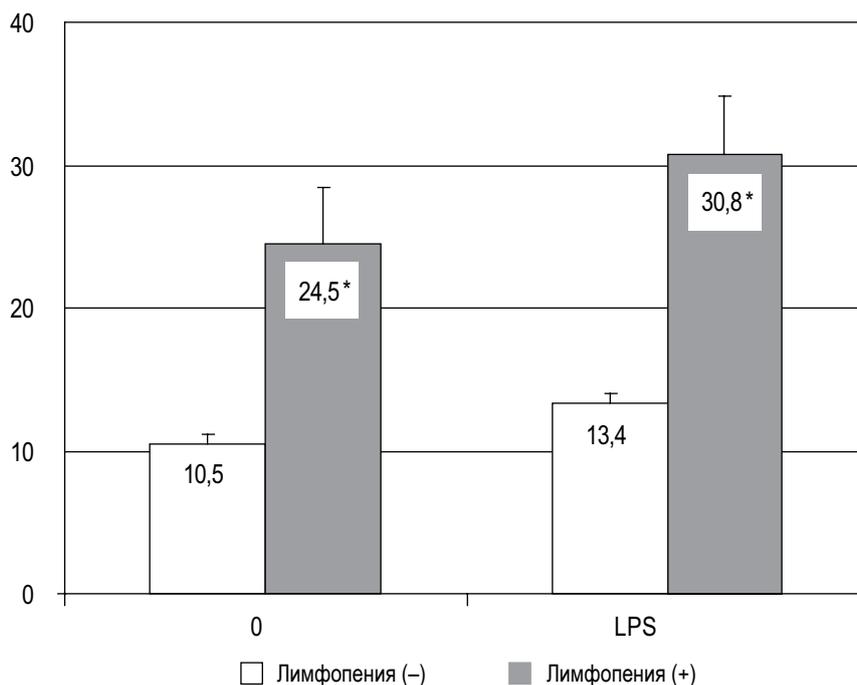
Полученные результаты показывают, что даже в отсутствие митогенного стимула (LPS) клетки цельной крови больных РМЖ активно секретируют хемокины и ростовые факторы гемоиммунопоза. Запуск продукции цитокинов в нестимулированных культурах цельной крови реализуется, очевидно, через механизмы ауто- и паракринной регуляции [3]. При этом важно отметить, что интенсивность спонтанной секреции IL-7, MCP-1 и MIP-1 $\beta$  является настолько выраженной, что дополнительная стимуляция клеток-продуцентов поликлональным активатором (LPS) не приводит к ее увеличению. Тем не менее в данном случае митогенную активность клеток крови нельзя расценивать как пребывание их в состоянии функциональной анергии, поскольку уровень продукции G-CSF и провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17) в ответ на LPS-стимуляцию значительно возрастает (ИБLPS варьирует от 3,7 до 125 расч.ед.).

Анализируя цитокиновый профиль больных РМЖ после лучевой терапии и хирургического лечения, можно говорить о сохранении функционального резерва системы цитокинов и секреторной активности клеток-продуцентов. При этом очевидно наличие цитокинового дисбаланса, который характеризуется преобладанием продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17) и хемокинов (MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) в сочетании с низким уровнем Th2/противовоспалительного IL-13. Наблюдаемый дисбаланс цитокинов на данном этапе противоопухолевой терапии, очевидно, связан с предшествующей лучевой терапией и хирургическим лечением. Такие агрессивные ятрогенные воздействия неизбежно сопровождаются развитием некротических и деструктивно-воспалительных процессов в тканях, что подтверждается выявлением у большинства пациентов классических лабораторных маркеров острофазового ответа (данные не представлены). Повышенная продукция провоспалительных цитокинов в данном случае может рассматриваться также как один из причинных факторов анемии, которая по нашим данным отчетливо выявляется у 64% больных РМЖ, включенных в исследование.

С циторедуктивными эффектами противоопухолевой терапии и необходимостью восстановления клеточного гомеостаза в периферической крови связано, очевидно, и повышение уровня ростовых факторов гемоиммунопоза (G-CSF и IL-7) [4, 20]. Как известно, IL-7 относится к семейству лимфопоэтических цитокинов, которое включает также IL-2, IL-4, IL-9,

IL-15 и IL-21. Отличительной характеристикой цитокинов этой группы является использование общей сигнальной  $\gamma$ -цепи ( $\gamma_c$ , CD132) при связывании со специфическим рецептором (IL-2R, IL-7R, IL-15R и т.д.). Основными продуцентами IL-7 считаются негемопоэтические стромальные клетки, локализованные в тимусе, периферических лимфоидных органах, коже, тонком кишечнике, печени и т.д. Тем не менее дендритные клетки, а также зрелые Т-лимфоциты способны секретировать IL-7, только в относительно меньших количествах. В настоящее время общепризнанно, что IL-7 играет ключевую роль в поддержании гомеостаза периферических Т-клеток, обеспечивая в нормальных физиологических условиях относительно стабильное количество и соотношение основных субпопуляций циркулирующих Т-лимфоцитов (наивных ( $T_N$ ) и Т-клеток-памяти ( $T_M$ ) среди  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов. Во многом это связано с тем, что функциональный рецептор к IL-7 (IL-7R $\alpha$ ) экспрессируется как на лимфоидных прогениторных клетках костного мозга и тимоцитах, так и на зрелых Т-клетках ( $T_N$  и  $T_M$ ) и В-лимфоцитах. Взаимодействие низкоаффинных TCR с пептидами и/или аутоантигенами, представленными клетками микроокружения лимфоидных тканей, экспрессирующими MHC I или II класса, в совокупности с IL-7-опосредованным сигналом обеспечивает выживание наивных Т-клеток. Кроме того, IL-7 поддерживает относительно медленное гомеостатическое деление (slow homeostatic cycling)  $T_N$  и  $T_M$  клеток, что в целом способствует сохранению физиологического баланса периферических Т-клеток с широким антигенным репертуаром [16, 7].

В условиях лимфопении, развивающейся, например, на фоне вирусной инфекции [25, 26], лучевой и/или полихимиотерапии [10] уровень IL-7 в циркуляции значительно увеличивается, главным образом потому, что резко уменьшается число клеток, способных его утилизировать. Проведенный нами корреляционный анализ также позволил выявить выраженную обратную взаимосвязь ( $r_s = -0,88$ ;  $p < 0,0001$ ) между уровнем IL-7 и абсолютным количеством циркулирующих лимфоцитов у больных РМЖ ( $n = 13$ ). Кроме того, сравнительный анализ больных РМЖ, различающихся по абсолютному количеству лимфоцитов периферической крови на момент обследования, показал (рис. 1), что содержание IL-7 в 24-часовых супернатантах клеток цельной крови пациенток с лимфопенией в 2-3 раза превышает аналогичные значения в оппозитной подгруппе женщин с сохраненным уровнем лимфоцитов ( $p_U < 0,05$ ).



**Рисунок 1.** Спонтанная и LPS-стимулированная продукция IL-7 в подгруппах больных РМЖ, оппозитных по уровню лимфоцитов в крови

**Примечания.** По оси абсцисс – условия культивирования клеток цельной крови в отсутствие стимуляции (0) и в присутствии LPS (LPS), по оси ординат – средние значения ( $M \pm S.E.$ ) продукции IL-7 (пкг/мл/ $10^6$  МНК). Белые столбики – пациентки без лимфопении ( $> 1,2 \times 10^9$ /л;  $1,34 \pm 0,01$ ;  $n = 3$ ) и серые столбики – пациентки с лимфопенией ( $< 1,2 \times 10^9$ /л;  $0,81 \pm 0,11$ ;  $n = 10$ ). \* –  $p_U < 0,05$ , достоверность различий между группами (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Считается, что в условиях лимфопении более широкая биодоступность IL-7 для циркулирующих T-клеток, которые в норме постоянно конкурируют между собой за его связывание, приводит к запуску гомеостатической периферической экспансии (homeostatic peripheral expansion, HPE) [16, 11, 27]. Данный механизм направлен, в первую очередь, на быстрое количественное восстановление пула периферических T-клеток. При этом, однако, антигенный репертуар и соотношение основных субпопуляций восстановленных T-клеток может претерпевать существенные трансформации, поскольку в пролиферативную экспансию вовлекаются наивные T-клетки, специфичные к низкоаффинным лигандам (перекрестным пептидам или аутоантигенам микроокружения), связывание с которыми в нормальных условиях не приводит к клеточному делению  $T_N$ -лимфоцитов. Важно отметить, что пролиферация  $T_N$ -клеток через механизм гомеостатической экспансии сопровождается сменой их мембранного и функционального фенотипа на фенотип  $T_M$ -лимфоцитов, однако такая конверсия происходит без промежуточного этапа активации и дифференцировки в эффекторные клетки [18, 13]. Стимулирующий эффект IL-7 в отношении запуска HPE может усиливаться

другими  $\gamma_c$ -цитокинами (IL-15, IL-21, IL-2), провоспалительными медиаторами и хемокинами, а также потенцироваться активационными сигналами со стороны дендритных клеток [19, 17]. Показано, что прямой и тесный контакт с дендритными клетками особенно важен для выживаемости и пролиферации  $CD4^+$ T-клеток, которые под влиянием соответствующих хемоаттрактантов попадают в тимусзависимые зоны вторичных лимфоидных органов, где и формируют иммунные синапсы с дендритными клетками. В этой связи следует отметить, что выявленная нами у больных РМЖ спонтанная гиперпродукция MIP-1 $\beta$ , по-видимому, является не случайной находкой, поскольку известно, что данный хемокин отличается от других C-C хемокинов (RANTES, MIP-1 $\beta$ ) селективной активностью именно в отношении наивных  $CD4^+$ T-клеток [8].

В различных экспериментальных моделях с использованием nude, SCID, Rag-дефицитных мышей было показано, что восстановление T-клеточного гомеостаза через HPE-механизм может приводить к манифестации системных аутоиммунных реакций [29]. Не исключается также участие HPE в развитии аутоиммунных осложнений у больных с ВИЧ-инфекцией и при ревматоидном артрите [15, 23]. Тем не ме-

нее в настоящее время признается, что для формирования аутоиммунной патологии на фоне лимфопении и гомеостатической экспансии периферических Т-клеток необходимо участие не только IL-7, но дополнительного второго сигнала [24]. В этом контексте обсуждается гиперпродукция IL-21 (например, у SCID мышей), деплеция регуляторных супрессорных Т-клеток (Treg, например, у RAG-дефицитных мышей), а также участие различных медиаторов тканевого воспаления, например, при ВИЧ-инфекции, когда у больных развивается IRIS (immune reconstitution inflammatory syndrome). Кроме того, большое значение для развития аутоиммунных реакций в результате НРЕ имеет, по-видимому, выраженность и продолжительность лимфопении. Так, например, на мышах, у которых с помощью анти-Т-клеточных моноклональных антител моделировали лимфопению различной степени тяжести, было показано, что адаптивный перенос  $T_N$  или  $T_M$ -клеток животным в условиях даже 90% деплеции пула циркулирующих Т-лимфоцитов не приводит к запуску НРЕ, которая эффективно индуцируется только у полностью Т-дефицитных Rag<sup>-/-</sup> мышей [12]. Было установлено, что регуляторные CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Т-клетки и клетки-памяти более резистентны к деплеции и активно конкурируют с  $T_N$ -клетками за связывание с IL-7, тем самым блокируя их пролиферативную экспансию и конверсию фенотипа в  $T_M$ . Авторы полагают, что в условиях транзиторной и/или частичной лимфопении более устойчивые Treg-клетки способны эффективно контролировать пролиферативную экспансию редуцированного количества эффекторных клеток аутореактивных Т-клонов.

В современной литературе феномен НРЕ обсуждается не только с позиции возможного риска развития аутоиммунных реакций, но и в качестве возможного механизма усиления иммунного ответа против слабоиммуногенных, например, опухолевых антигенов. Так, в отдельных работах было показано, что на фоне лимфопении или в период раннего восстановления пула циркулирующих лимфоцитов использование дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом, или адаптивный перенос эффекторных Т-лимфоцитов позволяет повысить эффективность противоопухолевого иммунного ответа за счет пролиферативной экспансии Т-клеточных клонов, специфичных к опухолевым антигенам [14, 9, 30, 31].

В заключение следует отметить, что проведенные нами исследования параметров иммунного и цитокинового статуса у больных РМЖ после лучевой терапии и хирургического лече-

ния свидетельствуют о наличии всех необходимых предпосылок для запуска гомеостатической пролиферативной экспансии периферических Т-клеток. В целом по группе обследованных нами пациенток регистрируется выраженная лимфопения, высокий уровень и, соответственно, большая биодоступность IL-7, повышенная спонтанная продукция хемокинов, а также провоспалительных цитокинов в ответ на митогенную стимуляцию. С одной стороны, полученную картину нельзя считать благоприятной, поскольку высокий уровень отдельных провоспалительных цитокинов ассоциируется с худшим прогнозом онкологического заболевания и меньшей эффективностью противоопухолевой терапии [21].

С другой стороны, восстановление Т-клеточного гомеостаза при таких условиях может пойти по пути пролиферативной экспансии Т-клеточных клонов, специфичных к слабоиммуногенным, опухолевым антигенам. Такой сценарий становится еще более вероятным, поскольку наши данные были получены уже на промежуточном этапе комплексной противоопухолевой терапии до начала ПХТ, проведение которой, очевидно, может дополнительно потенцировать механизмы запуска НРЕ. Интерес для дальнейших исследований представляет анализ изучаемых параметров с позиций реконституции иммунного гомеостаза на фоне ПХТ-индуцированной лимфопении, а также изучение возможности клинического применения системной цитокинотерапии с целью усиления экспансии периферических Т-клеток, в том числе специфичных к опухолевым антигенам. Исследования в этой области могут привести к разработке протоколов активной иммунотерапии с использованием лимфопоэтических  $\gamma_c$ -цитокинов (например, rIL-2, rIL-7) и АГ-специфических дендритных и/или эффекторных Т-клеток [28], что позволит повысить эффективность традиционной противоопухолевой терапии. Главной проблемой при разработке таких протоколов, конечно, остается потенциальный риск активации клонов аутореактивных Т-клеток, поэтому необходимым требованием к новым иммунотерапевтическим стратегиям должна быть их нацеленность на преимущественную экспансию опухоль-специфических или, по крайней мере, поликлональных Т-лимфоцитов.

## Список литературы

1. Антонов В.Г., Козлов В.К. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы. Внеклеточные и клеточные механизмы общей иммунодепрес-

- сии и иммунной резистентности // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, № 1. — С. 8-19.
2. Зотов А.С., Белик Е.О. Мастопатии и рак молочной железы. — М.: МЕДпресс-информ, 2005. — 112 с.
  3. Козлов В.А. Некоторые аспекты проблемы цитокинов // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1, № 1. — С. 5-8.
  4. Козлов В.А. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор: физиологическая активность, патофизиологические и терапевтические проблемы // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, № 2. — С. 3-15.
  5. Летагин В.П. Первичные опухоли молочной железы. — М.: Миклош, 2004. — 332 с.
  6. Останин А.А., Черных Е.Р. Сравнительная оценка уровня 17 цитокинов в сыворотке и цельной крови здоровых доноров методом проточной флюориметрии // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т. 2, № 2. — С. 25-32.
  7. Ярилин А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов // Иммунология. — 2004. — № 5. — С. 312-320.
  8. Adams D.H., Harvath L., Bottaro D.P., Interante R., Catalano G., Tanaka Y., Strain A., Hubscher S.G., Shaw S. Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein 1 beta: structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeletal changes and subset-preferential migration in T-cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91, N 15. — P. 7144-7148.
  9. Asavaroengchai W., Kotera Y., Mule J.J. Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99, N 2. — P. 931-936.
  10. Bolotin E., Annett G., Parkman R., Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count // Bone Marrow Transplant. — 1999. — Vol. 23. — P. 783-788.
  11. Bosco N., Agenès F., Ceredig R. Effects of increasing IL-7 availability on lymphocytes during and after lymphopenia-induced proliferation // J. Immunol. — 2005. — Vol. 175. — P. 162-170.
  12. Bourgeois C., Stockinger B. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T-cells and memory T-cells prevent lymphopenia-induced proliferation of naive T-cells in transient states of lymphopenia // J. Immunol. — 2006. — Vol. 177. — P. 4558-4566.
  13. Cho B.K., Rao V.P., Ge Q., Eisen H.N., Chen J. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T-cells to differentiate directly into memory T-cells // J. Exp. Med. — 2000. — Vol. 192. — P. 549-556.
  14. Dummer W., Niethammer A.G., Baccala R., Lawson B.R., Wagner N., Reisfeld R.A., Theofilopoulos A.N. T-cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity // J. Clin. Invest. — 2002. — Vol. 110, N 2. — P. 185-192.
  15. Ende N., Schwartz R.A. Autoimmunity and AIDS. A commentary // J. Exp. Med. — 1997. — Vol. 28. — P. 273-274.
  16. Fry T.J., Mackall C.L. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T-cell maintenance // J. Immunol. — 2005. — Vol. 174. — P. 6571-6576.
  17. Ge Q., Palliser D., Eisen H.N., Chen J. Homeostatic T-cell proliferation in a T-cell-dendritic cell coculture system // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99. — P. 2983-2988.
  18. Goldrath A.W., Luckey C.J., Park R., Benoist C., Mathis D. The molecular program induced in T-cells undergoing homeostatic proliferation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101. — P. 16885-16890.
  19. Goldrath A.W., Sivakumar P.V., Glaccum M., Kennedy M.K., Bevan M.J., Benoist C., Mathis D., Butz E.A. Cytokine requirements for acute and basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8 T-cells // J. Exp. Med. — 2002. — Vol. 195, N 12. — P. 1515-1522.
  20. Guimond M., Fry T.J., Mackall C.L. Cytokine signals in T-cell homeostasis // J. Immunother. — 2005. — Vol. 28, N 4. — P. 289-294.
  21. Hofseth L.J., Wargovich M.J. Inflammation, cancer, and targets of ginseng // J. Nutr. — 2007. — Vol. 137, N 1. — P. 183-185.
  22. Hu H.M., Poehlein C.H., Urba W.J., Fox B.A. Development of antitumor immune responses in reconstituted lymphopenic hosts // Cancer Res. — 2002. — Vol. 62. — P. 3914-3919.
  23. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon M.W., Goronzy J.J., Weyand C.M. T-cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97. — P. 9203-9208.
  24. Krupica T.Jr., Fry T.J., Mackall C.L. Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model // Clin. Immunol. — 2006. — Vol. 120, N 2. — P. 121-128.
  25. Mastroianni C.M., Forcina G., d'Ettore G., Lichtner M., Mengoni F., D'Agostino C., Vullo V. Circulating levels of interleukin-7 in antiretroviral-naive and highly active antiretroviral therapy-treated HIV-infected patients // HIV Clin. Trials. — 2001. — Vol. 2. — P. 108-112.
  26. Napolitano L.A., Grant R.M., Deeks S.G., Schmidt D., De Rosa S.C., Herzenberg L.A., Herndier B.G., Andersson J., McCune J.M. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis // Nat. Med. — 2001. — Vol. 7. — P. 73-79.
  27. Seddon B., Zamoyska R. TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive

T-cells // J. Immunol. – 2002. – Vol. 169. – P. 3752-3759.

28. Shimizu K., Fields R.C., Giedlin M., Mule J.J. Systemic administration of interleukin-2 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96. – P. 2268–2273.

29. Theofilopoulos A.N., Dummer W., Kono D.H. T-cell homeostasis and systemic autoimmunity // J. Clin. Invest. – 2001. – Vol. 108, N 3. – P. 335-340.

30. Wang L-X., Li R., Yang G., Lim M., O'Hara A., Chu Y., Fox B.A., Restifo N.P., Urba W.J., Hu H-M. Interleukin-7-dependent expansion and persistence of melanoma-specific T-cells in lymphodepleted

mice lead to tumor regression and editing // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65. – P. 10569-10577.

31. Wang L-X., Shu S., Plautz G.E. Host lymphodepletion augments T cell adoptive immunotherapy through enhanced intratumoral proliferation of effector cells // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65. – P. 9547-9554.

32. Yagoob P., Newsholme E.A., Calder P.C. Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells // Cytokine. – 1999. – Vol. 11, N 8. – P. 600-605.

*поступила в редакцию 02.02.2007*

*отправлена на доработку 08.02.2007*

*принята к печати 18.02.2007*