

# РЕАКЦИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК НА ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЕ АНТИГЕНЫ, ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ЖЕНЩИН СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ И С ДИСПЛАЗИЕЙ ГЕНИТАЛЬНОЙ СФЕРЫ

Аутеншлюс А.И., Лыков А.П., Шкунов А.Н., Вараксин Н.А.,  
Морозов Д.В., Прохожев В.Б., Михайлова Е.С.,  
Кретинин Г.А., Красильников С.Э.

*Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН, г. Новосибирск*

**Резюме.** Изучен характер реакции мононуклеарных клеток крови у женщин с патологией генитальной сферы на фетальные протеины, проведено сопоставление значений реакции с уровнями про- и противовоспалительных факторов иммунитета и с патогистологической картиной злокачественных новообразований и дисплазий эпителия шейки матки. Показано, что в тех случаях, когда происходит увеличение не менее чем на 15% количества CD8<sup>+</sup> лимфоцитов после инкубации мононуклеаров с фетальными протеинами (позитивная реакция) по сравнению с контролем и отмечаются более высокие уровни антител к TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ , опухоль характеризуется более низкой степенью злокачественности. Позитивная реакция мононуклеаров на фетальные протеины, сопряженная с повышенными уровнями IFN $\gamma$  и антител к TNF $\alpha$ , выявляется при II-III степенях дисплазии эпителия шейки матки. Делается заключение о возможности использования показателей реакции мононуклеаров на феталь-

ные протеины для определения степени злокачественности опухоли генитальной сферы женщин и степени тяжести дисрегенераторных процессов в эпителии шейки матки.

## **Адрес для переписки:**

Аутеншлюс Александр Исаевич  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2,  
ГУ НИИ МББ СО РАН,  
лаборатория физико-химической индикации  
иммунных процессов.  
Тел.: (383) 226-94-83, доп. 129.  
Факс: (383) 278-18-75.

*Ключевые слова:* мононуклеары, антигены, цитокины, антитела, рак, дисплазия.

*Autenshlus A.I., Lykov A.P., Shcunov A.N., Varaksin N.A., Morozov D.V., Prohozhev V.B., Mikhaylova E.S., Kretinin G.A., Krasillnikov S.E.*

## RESPONSE OF MONONUCLEAR CELLS TO CANCER-ASSOCIATED ANTIGENS, HUMORAL FACTORS OF IMMUNITY, AND PATHOHISTOLOGICAL FINDINGS IN WOMEN WITH GENITAL MALIGNANCIES CERVICAL EPITHELIAL DYSPLASIA

**Abstract.** In vitro response of blood mononuclear cells to cancer-associated antigens was studied in women with genital pathology, and these results were compared with serum levels of pro- and anti-inflammatory factors of immunity, like as with histological features of genital cancer and cervical epithelial dysplasia. In vitro cellular response was regarded as positive, if relative amounts of CD8-positive lymphocytes increased by > 15% following incubation of blood mononuclears with cancer-associated antigens. Positive reaction and elevated serum levels of anti-TNF $\alpha$  and anti-IFN $\gamma$  antibodies were associated with lesser malignancy of tumor, as proven by histological findings in the women with genital cancer. A positive cellular reaction was associated with increased serum levels of IFN $\gamma$  and anti-TNF $\alpha$  in women with grade II–III cervical epithelial dysplasia. It is concluded about potential applicability of testing mononuclears with fetal proteins, to determine a grade of malignancy for the female genital tumors, as well as a degree of regenerative disturbances of cervical epithelium. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 513-518)

## Введение

Образование злокачественной опухоли сопровождается целым рядом структурных и функциональных изменений, которые отличают ее от нормальной ткани. Одним из признаков, характеризующих опухоль, является экспрессия опухолеассоциированных антигенов, к которым относятся и фетальные протеины (ФП).

В исследованиях, проведенных у больных раком легкого и туберкулезом легких, раком молочной железы и фиброаденоматозом, показано увеличение относительного содержания клеток, экспрессирующих CD8-антиген после инкубации мононуклеаров (МНК) крови с ФП, которое зависело от патоморфологической картины опухоли, а также от наличия дисплазии в эпителиальной ткани при хроническом инфекционно-воспалительном процессе и было сопряжено с показателями гуморальных факторов иммунитета [1-4]. Повышенный фон провоспалительных цитокинов может способствовать возникновению метаморфоз в эпителии, а через них — злокачественных новообразований [5, 7].

В продолжение вышеуказанных работ целью настоящего исследования явилось изучение характера реакции МНК на ФП и показателей гуморальных факторов иммунитета в зависимости от патоморфологической картины злокачественных новообразований и от наличия дисрегуляторных процессов в генитальной сфере женщин.

## Материалы и методы

Объектом исследования служила периферическая кровь 61 женщины (средний возраст  $45 \pm 1,5$  лет) и операционный материал от 31 женщины. Среди больных у 19 женщин диагностировали рак (у 12 — аденокарцинома шейки и тела матки, у 7 — плоскоклеточный рак). Больные со злокачественными новообразованиями,

составившие I группу, были разделены в зависимости от реакции МНК на ФП на две подгруппы Ia и Ib.

12 женщин, у которых была выявлена дисплазия эпителия шейки матки — II группа (дисплазия I степени — у 5, а II и III степени — у 7) были также разделены в зависимости от реакции МНК на ФП на две подгруппы — IIa и IIб. 34 женщины без признаков атипии и обострения каких-либо инфекционно-воспалительных заболеваний составили группу сравнения — III группа, которая в связи с отсутствием в ней реакции МНК на ФП не была разделена. Все женщины проходили обследование и, по показаниям, лечение в Новосибирском областном онкологическом диспансере в 2006 году.

Определение относительного содержания CD8<sup>+</sup> лимфоцитов проводили методом непрямой иммунофлюоресценции с помощью моноклональных антител серии ИКО 31 (НПЦ «Медбiosoпектр», Москва), согласно прилагаемой инструкции.

В качестве опухолеассоциированных антигенов применяли ФП в изотоническом растворе хлорида натрия, содержащие раковоэмбриональный антиген — 84 МЕ/мл, хорионический гонадотропин человека — 170 МЕ/мл, нейроспецифическую энolahзу — 1,35 МЕ/мл, углеводные антигены: СА-19-9 — 144 МЕ/мл и СА 125 — 512 МЕ/мл, альфа-фетопротеин — 172 МЕ/мл и микроглобулин человека — 4 МЕ/мл. Оценку реакции на ФП проводили в соответствии с патентом № 2118819 по изменению относительного содержания CD8<sup>+</sup> клеток после инкубации МНК с ФП (100 мкл, исходная концентрация белка 2,5 мг/мл) *in vitro* в течение 1 ч по сравнению с контрольной пробой, содержащей вместо ФП 100 мкл изотонического раствора хлорида натрия. Для подтверждения специфичности реакции параллельно инкубировали МНК с раствором бычьего сывороточного

альбумина по указанной выше технологии и в той же концентрации по белку.

Позитивной считалась реакция, при которой относительное содержание CD8<sup>+</sup> лимфоцитов повышалось после инкубации МНК с ФП на 15% и более по сравнению с соответствующей контрольной пробой [1]. Во всех остальных случаях реакция считалась негативной. Пороговое значение достоверности реакции, равное 15%, превышало допустимый предел ошибки [6].

В сыворотке крови определяли содержание про- и противовоспалительных цитокинов с использованием наборов: альфа-ФНО-ИФА-Бест, ИЛ-6-ИФА-Бест, ИЛ-8-ИФА-Бест, ИЛ-1бета-ИФА-Бест, гамма-Интерферон-ИФА-Бест, ИЛ-4-ИФА-Бест и рецепторного антагониста ИЛ-1-ИФА-Бест (ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово Новосибирской области). Определение уровня АТ класса G к TNF $\alpha$ , к IFN $\alpha$  (смесь различных подтипов натурального IFN $\alpha$  из лейкоцитов крови человека) и к IFN $\gamma$ , проводили также с помощью твердофазного ИФА.

После хирургического вмешательства проводили гистологическое исследование удаленного материала. Патогистологическую картину злокачественного процесса характеризовали в баллах по следующим признакам:

- граница опухоли с окружающей тканью: четкие – 1 балл, наряду с четкими границами имеются крупные участки ответвления – 2 балла, наряду с четкими границами опухолевого узла имеются мелкие тонкие тяжи – 3 балла, четкость границ отсутствует, имеется диффузный рост опухоли – 4 балла;

- опухолевые клетки в сосудах: опухолевых клеток в сосудах нет – 1 балл, наличие опухолевых клеток в сосудах сомнительно – 2 балла, единичные клетки опухоли в сосудах – 3 балла, много клеток в сосудах – 4 балла;

- инфильтрация: отсутствует – 1 балл, слабая – 2 балла, умеренная – 3 балла, выраженная – 4 балла;

- митозы в поле зрения: отсутствуют – 1 балл, единичные – 2 балла, 2-3 митоза – 3 балла, 4-5 митозов – 4 балла, 6-10 митозов – 5 баллов, более 10 митозов – 6 баллов;

- патологические митозы в поле зрения: отсутствуют – 1 балл, единичные – 2 балла, в большом количестве – 3 балла;

- клеточные элементы различной степени дифференцировки в опухоли (в %): высокодифференцированные (ВД), умереннодифференцированные (УД) и низкодифференцированные (НД);

- степень злокачественности: I степень – 1 балл, II степень – 2 балла, III степень – 3 балла;

- метастазы в регионарные лимфоузлы: нет – 1 балл, есть – 2 балла.

Дисрегенераторный процесс также был охарактеризован в баллах: дисплазия легкая – I степень – 1 балл, дисплазия умеренная – II степень – 2 балла и дисплазия тяжелая – III степень – 3 балла.

Обработка вариационных рядов включала подсчет значений средних величин (М) и ошибки средней (m). Статистическая значимость различий оценивалась с помощью критерия Стьюдента, критерия Вилкоксона-Манна-Уитни и точного критерия Фишера. Ранговую корреляцию определяли по Спирмену, статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statgraphics Plus. Результаты представлены в таблицах и на рисунке.

## Результаты и обсуждение

При анализе значений про- и противовоспалительных факторов иммунитета было установлено, что у женщин при раке генитальной сферы определяются достоверно более высокие уровни только IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-6 и IL-1RA по сравнению с аналогичными показателями женщин III группы (табл. 1).

Изучение ответа МНК на ФП показало его неоднозначный характер у женщин со злокачественными новообразованиями, который заключался как в позитивной, так и в негативной реакции клеток крови (табл. 1 и 2).

При позитивной реакции МНК на ФП патоморфологическая картина опухоли характеризовалась более низким количеством патологических митозов в поле зрения, низким относительным содержанием низкодифференцированных и высоким – высокодифференцированных клеток в опухоли, а также более низкой степенью злокачественности. Кроме того, при позитивной реакции уровни АТ к TNF $\alpha$  и АТ к IFN $\gamma$  были достоверно более высокими по сравнению с аналогичными показателями при негативной реакции МНК на ФП, причем уровень первых был также достоверно более высоким по сравнению с аналогичным показателем III группы. При негативной реакции МНК на ФП только уровень АТ к IFN $\gamma$  был достоверно более низким по сравнению с III группой.

По всем остальным изучаемым показателям не обнаружено достоверных различий между группами больных раком.

Следовательно, позитивная реакция МНК на ФП сопряжена как с более высоким уровнем АТ к провоспалительным цитокинам, хотя по содержанию самих цитокинов не было получено каких-либо различий в зависимости от характера реакции МНК на ФП при раке генитальной сферы, так и с меньшей степенью злокачественности новообразования.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ИММУНИТЕТА У ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУПП

Группы	IL-1β (пкг/мл)	IFNγ (пкг/мл)	IL-6 (пкг/мл)	IL-1RA (пкг/мл)	АТ к TNFα (ед. опт. пл.)	АТ к IFNγ (ед. опт. пл.)
I. больные со злокачественными новообразованиями (n = 19) из них:	123,0±15,6 P <sub>I-III</sub> < 0,042	26,9±11,1 P <sub>I-III</sub> < 0,046	50,6±10,0 P <sub>I-III</sub> < 0,027	556,8±116,0 P <sub>I-III</sub> < 0,007	0,69±0,06	0,49±0,04 P <sub>I-III</sub> < 0,05
Ia. больные с позитивной реакцией МНК на ФП (n = 8)	138,6±30,9	16,5±6,3 P <sub>Ia-III</sub> < 0,049	41,5±18,1	667,2±245,9	0,80±0,09 P <sub>Ia-III</sub> < 0,037 P <sub>Ia-Ib</sub> < 0,034	0,56±0,06 P <sub>Ia-Ib</sub> < 0,05
Iб. больные с негативной реакцией МНК на ФП (n = 11)	109,2±17,4	34,4±19,8	58,7±50,3	458,6±108,9	0,59±0,07	0,43±0,04
III. группа сравнения (n = 34)	77,8±5,1	3,8±0,9	13,4±5,4	458,1±81,1	0,61±0,04	0,62±0,09

Корреляционный анализ показателей при раке генитальной сферы позволил установить следующие достоверные взаимосвязи: обратную корреляционную связь степени злокачественности с относительным содержанием клеток с фенотипом CD8, с процентом их прироста после инкубации МНК с ФП ( $r = -0,650$ ;  $p < 0,004$  и  $r = -0,708$ ;  $p < 0,0015$  соответственно), с относительным содержанием в опухоли высокодифференцированных клеток ( $r = -0,750$ ;  $p < 0,001$ ) и прямую корреляцию с патологическими митозами ( $r = 0,570$ ;  $p < 0,015$ ), с относительным содержанием в опухоли низкодифференцированных клеток ( $r = 0,72$ ;  $p < 0,01$ ), с содержанием в крови TNFα ( $r = 0,482$ ;  $p < 0,05$ ) и IFNγ ( $r = 0,650$ ;  $p < 0,005$ ).

Анализируя результаты определения про- и противовоспалительных факторов иммунитета у женщин с дисрегенераторными процессами в эпителии шейки матки следует отметить сопря-

женность их значений с реакцией МНК на ФП (табл. 3).

Так, у женщин с дисплазией при позитивной реакции МНК на ФП уровень IFNγ был значительно более высоким по сравнению с группой женщин МНК, которых дали негативную реакцию на ФП, что косвенно подтверждает связь дисрегенераторных процессов с хроническим воспалением. Уровень АТ к TNFα также был более высоким у женщин при позитивной реакции МНК на ФП, а уровень АТ к IFNα был достоверно более низким, чем при негативной реакции клеток.

Позитивная реакция МНК на ФП в подавляющем большинстве случаев встречалась у женщин с дисплазией эпителия шейки матки II и III степеней, а негативная реакция отмечалась в основном при дисплазии I степени (рис.).

Как указывалось в наших предыдущих работах [3, 4], продукция организмом АТ к про-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ ОПУХОЛЕЙ У ЖЕНЩИН СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ГЕНИТАЛЬНОЙ СФЕРЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ХАРАКТЕРА РЕАКЦИИ МНК НА ФП

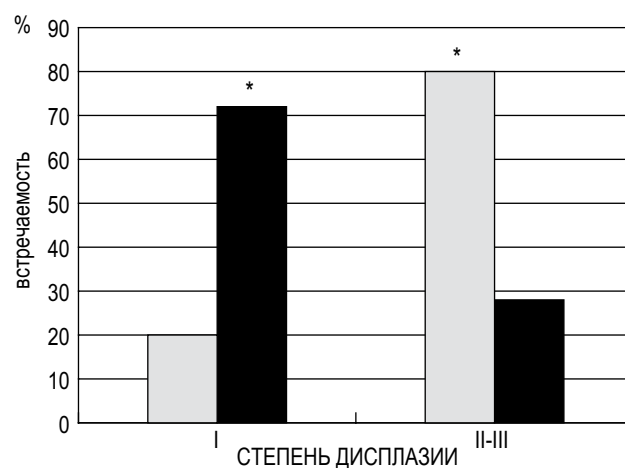
Группы	Патологические митозы (в баллах)	НД (в %)	ВД (в %)	Степень злокачественности (в баллах)
Ia. больные с позитивной реакцией МНК на ФП (n = 8)	1,6±0,2 P <sub>Ia-Ib</sub> < 0,03	2,7±0,9 P <sub>Ia-Ib</sub> < 0,01	39,9±9,9 P <sub>Ia-Ib</sub> < 0,04	1,9±0,1 P <sub>Ia-Ib</sub> < 0,05
Iб. больные с негативной реакцией МНК на ФП (n = 11)	2,1±0,1	41,2±15,9	18,5±7,5	2,3±0,1

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН С ДИСПЛАЗИЕЙ ЭПИТЕЛИЯ ШЕЙКИ МАТКИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ХАРАКТЕРА РЕАКЦИИ МНК НА ФП

Группы	IFN $\gamma$ (пкг/мл)	АТ к TNF $\alpha$ (ед. опт. пл.)	АТ к IFN $\alpha$ (ед. опт. пл.)
II. больные с дисплазией (n = 12) из них:	30,50 $\pm$ 16,12 P <sub>II-III</sub> < 0,03	0,60 $\pm$ 0,06	0,60 $\pm$ 0,09
IIa. женщины с позитивной реакцией (n = 6)	57,25 $\pm$ 25,00 P <sub>IIa-IIб</sub> < 0,03	0,71 $\pm$ 0,06 P <sub>IIa-IIб</sub> < 0,05	0,46 $\pm$ 0,10 P <sub>IIa-IIб</sub> < 0,04
IIб. женщины с негативной реакцией (n = 6)	3,75 $\pm$ 1,60	0,53 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,11
III. группа сравнения (n = 34)	9,04 $\pm$ 2,77	0,61 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,05

воспалительному некротизирующему фактору может быть расценена как защитный механизм, направленный на нейтрализацию его действия на опухоль (особенно при высокодифференцированном варианте рака) и на нормальные ткани. Не исключено, что это предположение можно экстраполировать и на дисрегенераторные процессы различной степени тяжести, но при условии, что на ранних этапах формирования клеточного атипизма сохраняется его более высокая дифференцировка.

Что же касается взаимосвязи дисрегенераторного процесса с показателями патоморфологической картины, то была выявлена прямая корреляция только между степенью дисплазии и количеством митозов в различных слоях плоского эпителия ( $r = 0,787$ ;  $p < 0,002$ ).



■ позитивная реакция МНК на ФП  
■ негативная реакция МНК на ФП

**Рисунок.** Встречаемость (в %) позитивной и негативной реакций мононуклеаров крови на фетальные протеины у женщин с различной степенью дисплазии эпителия шейки матки

**Примечание:** \* – достоверность различия Fisher  $p < 0,001$ .

Таким образом, позитивная реакция МНК на ФП, свидетельствующая о потенциальной способности иммунокомпетентных клеток реагировать на ОАА экспрессией CD8 антигена, являющегося маркером цитотоксических Т-лимфоцитов, сопряженная с повышенными уровнями АТ к TNF $\alpha$  и АТ к IFN $\gamma$ , может служить критерием степени злокачественности опухоли, а при сопряженности только с АТ к TNF $\alpha$  – критерием атипии эпителия шейки матки.

## Список литературы

1. Аутеншлюс А.И., Иванова Г.Г., Столярова В.М., Михайлова Е.С. Реакция лимфоцитов и гуморальный ответ на опухолеассоциированные антигены у онкологических больных // Бюл. СО РАМН. – 1999. – № 3-4. – С. 60-63.
2. Аутеншлюс А.И., Иванова Г.Г., Сидоров С.В. Ответ лимфоцитов больных фиброаденоматозом и раком молочной железы на опухолеассоциированные антигены in vitro // Иммунология. – 2003. – № 1. – С. 26-28.
3. Аутеншлюс А.И., Шкунов А.Н., Иванова Г.Г., Проскура А.В., Михайлова Е.С., Седова Ю.В., Кузнецова Н.Б., Морозов Д.В., Клименков А.В., Сидоров С.В. Содержание цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и уровни антител к TNF $\alpha$  у больных с онкологическими и воспалительными заболеваниями // Цитокины и воспаление. – 2005. – № 3. – С. 11-15.
4. Аутеншлюс А.И., Шкунов А.Н., Морозов Д.В. Реакция мононуклеарных клеток на фетальные протеины при предраковых состояниях // Abstracts of the congress «Immune-mediated diseases: from Theory to Therapy». – М., 2005. – С. 168.
5. Белокриницкая Т.Е., Витковский Ю.А., Пономарева Ю.Н., Мочалова М.Н., Ломнева Г.М. Фактор некроза опухоли  $\alpha$  и трансформирующий

фактор роста  $\beta$  в регуляции апоптоза и пролиферации клеток при дисплазии и раке шейки матки // Цитокины и воспаление. — 2006. — № 1. — С. 31-33.

6. Леонова Т.Я., Степанова Е.Г. Контроль качества лабораторных исследований: Методические рекомендации для врачей-лаборантов. — Новосибирск, 1993. — 23 с.

7. Шварцбурд П.М. Хроническое воспаление повышает риск развития эпителиальных

новообразований, индуцируя предраковое микроокружение: анализ механизмов дисрегуляции // Вопр. онкологии. — 2006. — Т. 52, № 2. — С. 137-144.

*поступила в редакцию 19.03.2007*

*принята к печати 30.05.2007*