

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ И ЛАКТОФЕРРИНА У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Долгих Т.И.¹, Бычкова Е.Ю.¹, Галиулин Р.Х.²

¹ Омская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию

² Омский областной клинический онкологический диспансер

Резюме. Изучение особенностей выработки цитокинов у больных со злокачественными новообразованиями явилось целью данной работы и проводилось на модели лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ) и меланомы. Были обследованы 65 онкологических больных в возрасте от 16 до 74 лет. Содержание IL-1 β , IL-4 и TNF α в сыворотке крови определяли методом твердофазного ИФА, а лактоферрина – методом ИФА. Результаты исследований показали, что у больных меланомой отмечается значительное снижение содержания IL-1 β и TNF α в сыворотке крови, что свидетельствовало о формировании неполноценного иммунного ответа. Среди больных ЛПЗ также преобладали лица с содержанием TNF α и IL-1 β ниже порогового значения нормы – 5 пг/мл, что указывало на дефект в секреции провоспалительных цитокинов. Показана взаимосвязь между содержанием лактоферрина и провоспалительных цитокинов. У больных меланомой после радикального лечения и у больных ЛПЗ без В-симптомов содержание лактоферрина было в пределах нормы, а у больных с генерализацией процесса и у больных ЛПЗ с В-симптомами прослеживалась тенденция к его повышению, что показывает целесообразность определения изученных показателей у больных с меланомой и ЛПЗ в качестве диагностических и прогностических критериев.

Ключевые слова: цитокины, лактоферрин, лимфолиферативные заболевания, меланома.

Dolgikh T.I., Bychkova E.J., Galyulin R.H.

CONTENTS OF CYTOKINES AND LACTOFERRIN IN ONCOLOGICAL PATIENTS

Abstract. The purpose of present work was to study the peculiarities of cytokine production in patients with malignant tumors, as exemplified by lymphoma and malignant melanoma. Sixty-five patients with malignancies (16 to 74 years old) have been surveyed. Contents of IL-1 β , IL-4, TNF α and lactoferrin were studied in blood serum using enzyme immunoassay technique. The results of study have shown that the patients with melanoma have a significant reduction in IL-1 β and TNF α in blood serum, thus being suggestive for development of deficient immune response. In malignant lymphoma, the patients did also exhibit subnormal values of TNF α and IL-1 β (below a threshold level of 5 pg/ml), thus supposing some deficiency in proinflammatory cytokine secretion. An interrelation was shown between the contents of lactoferrin and proinflammatory cytokines. After radical treatment of melanoma, like as in lymphoma patients free of B-symptoms, the lactoferrin contents were within normal limits, whereas in the patients with generalization of malignancy, and in lymphoma patients with B-symptoms, a trend to its increase has been established. Determination of the mentioned parameters in patients with lymphoma and malignant melanoma would provide useful diagnostic and predictive criteria in these clinical conditions. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 1, pp 67-70)

Цитокиновый статус в значительной степени определяется количеством клеток, продуцирующих цитокины, их способностью отвечать или не отвечать на регуляторные сигналы, а также

реакциями на эти цитокины клеток различных типов, имеющих соответствующие рецепторы. Продукция цитокинов и вызываемые ими реакции в значительной степени могут быть изменены у иммунокомпрометированных больных [10, 14].

Особую группу иммунокомпрометированных больных составляют больные злокачественными новообразованиями. На формирование иммунодефицита у этих больных оказывает не только злокачественное новообразование, но и противо-

Адрес для переписки:

Долгих Татьяна Ивановна
644010, г. Омск-10, ул. Масленникова, 15, кв.187.
Тел.: 8 (913) 968-14-85.
E-mail: alnik76@mail.ru

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ И ЛПЗ

Показатель	Больные меланомой				Больные ЛПЗ				Практически здоровые			
	n	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	n	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	n	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
TNF α , пг/мл	23	0,0	0,0	56,2	38	11,2	0,0	48,0	11	32,8	12,2	46,9
IL-1 β , пг/мл	23	0,7* ^	0,0	3,8	42	5,5	0,0	21,5	11	19,5	9,5	40,9
IL-4, пг/мл	9	6,7	0,7	9,1	13	16,1	7,5	36,8	14	9,1	5,2	23,2

Примечание: * – достоверные различия с практически здоровыми при $p < 0,001$; ^ – достоверные различия между группами при $p < 0,05$.

опухолевая терапия. Изучение состояния цитокиновой системы у лиц с иммунозависимыми злокачественными новообразованиями [8]: лимфопролиферативными заболеваниями (ЛПЗ) и меланомой, и явилось целью данной работы. По данным одних авторов, в сыворотке крови больных ЛПЗ отмечено низкое содержание цитокинов, в частности, IL-1 β и TNF α [10, 15]. По данным других авторов [7], обнаружено повышение уровня IL-1 β в сыворотке крови при лимфолиферативных процессах. Провоспалительные цитокины играют важную роль в патогенезе злокачественных лимфом: они могут продуцироваться неопластическими клетками [13] и воздействовать как на злокачественно трансформированные, так и НК-клетки. Феномен экспрессии цитокинов при лимфолиферативных заболеваниях можно рассматривать в двух аспектах: 1) как фактор патогенеза (лимфоциты – основной источник цитокинов); 2) цитокины – маркеры лимфоцитов, вовлеченных в опухолевый процесс [2].

Злокачественная меланома сопровождается дисбалансом содержания провоспалительных цитокинов. При исследовании цитокинового статуса у больных меланомой выявлено значительное снижение содержания IL-2 и IFN γ и повышение уровней IL-4, IL-6, IL-10 по сравнению со здоровыми индивидами [4, 11, 12].

Особое внимание в последние годы уделяется изучению маркеров воспаления и активации иммунитета [5]. Характерным лабораторным признаком воспалительных и инфекционных заболеваний является увеличение синтеза белков плазмы (так называемые острофазовые белки), к которым относится и лактоферрин. Лактоферрин – железосвязывающий гликопротеин с молекулярной массой 83 000 Da, является важным компонентом поддержания гомеостаза систем организма, участвуя в процессах транспорта железа, обладая антимикробной, антиоксидантной и противовоспалительной активностью. Изменения уровней содержания лактоферрина выявляются при многих патологических состояниях [1]. В последние годы появились публикации, в которых отмечено наличие взаимосвязи между уровнями лактоферрина и провоспалительных цитокинов [3, 9]. Данный факт позволяет использовать недорогую и доступную тест-систему

для определения лактоферрина иммуноферментным методом с целью косвенной оценки активности провоспалительных цитокинов.

Материалы и методы

В простое слепое исследование были включены 65 больных злокачественными новообразованиями в возрасте от 16 до 74 лет, средний возраст составил $44,57 \pm 13,85$. У всех больных диагноз злокачественного новообразования был верифицирован гистологически и сформулирован в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10).

Среди обследованных были: больные лимфогрануломатозом – 23 человека; больные неходжкинскими лимфомами – 19 человек; больные злокачественной меланомой – 23 человека; контрольную группу составили 14 практически здоровых лиц. Распространенность злокачественного процесса определяется в соответствии с клинической классификацией, принятой в 1971 году в Ann-Arbor и вошедшей в 4-е издание классификации злокачественных опухолей по системе TNM. Среди больных лимфолиферативными заболеваниями (ЛГМ и неходжкинские лимфомы) с I стадией – 3 больных, со II – 23, с III – 15, с IV – 8. Больные ЛПЗ каждой стадии разделены на группы А и В в зависимости от отсутствия (А) или наличия (В) общих симптомов: ночные профузные поты, повышение температуры выше 38 $^{\circ}$ C не менее 3-х дней подряд без признаков воспалительного процесса, похудание на 10% массы тела за последние 6 месяцев. Группу больных меланомой составили 27 человек с I стадией (T₁₋₂N₀M₀), со II – 30 больных (T₃N₀M₀), с III – 10 пациентов (T₂₋₃N₁M₀ и T₄N₀M₀).

Изучались уровни ключевых провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов и острофазного белка – лактоферрина. Содержание IL-1 β , IL-4 и TNF α в сыворотке крови определяли методом твердофазного ИФА с использованием тест-системы ООО «Протеиновый контур», (Россия, г. Санкт-Петербург). Содержание острофазного белка – лактоферрина – исследовали методом ИФА при помощи набора фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (Россия, г. Новосибирск).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows [6] с использованием U-критерия Манна–Уитни. Для выявления межгрупповых различий по качественным клиническим и лабораторным признакам использовался точный метод Фишера (ТМФ) для малых выборок. Для обнаружения корреляционных связей между клиническими и иммунологическими признаками применялся коэффициент корреляции Спирмена. Статистически значимыми различия считали при $p \leq 0,05$.

Результаты

Анализ показателей цитокинового статуса (табл. 1) выявил, что у больных меланомой наблюдалось низкое содержание провоспалительного цитокина IL-1 β по сравнению с контрольной группой (U; $p < 0,001$). Содержание TNF α и IL-4 достоверно не отличалось от донорской группы.

В то же время среди больных меланомой преобладали лица с крайне низким содержанием TNF α и IL-1 β , на основании чего были получены статистически значимые различия с контролем по частоте встречаемости низкого уровня цитокинов, что свидетельствовало об ограниченном синтезе провоспалительных цитокинов. Так, из 23 больных меланомой у 15 больных концентрация TNF α (ТМФ; $p = 0,01$) и у 18 больных содержание IL-1 β (ТМФ; $p = 0,005$) были ниже 5 пг/мл.

У больных меланомой было установлено статистически значимое различие по содержанию IL-1 β в зависимости от распространенности злокачественного процесса. В группе больных без генерализации процесса медиана и интерквартильный размах составили 1,5 пг/мл (от 0 до 26,6 пг/мл), а при генерализации – 0,6 пг/мл (от 0–2,65 пг/мл) (U; $p < 0,05$). Достоверных межгрупповых различий по содержанию IL-1 β и TNF α зафиксировано не было, но прослеживалась тенденция к снижению их концентрации при генерализации процесса. Факт дефицита цитокинпродуцирующей активности лейкоцитов подтверждает статистически значимое повышение РТМЛ, стимулированной ФГА, в 3,5 раза (U; $p < 0,001$) как у радикально пролеченных больных меланомой, так и при прогрессировании злокачественного процесса.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что у больных меланомой наблюдается дефицит выработки провоспалительных цитокинов, это является одной из предпосылок несостоятельности или позднего развития эффекторных реакций иммунного ответа.

Второй фрагмент работы посвящен изучению состояния цитокиновой системы у больных ЛПЗ. При исследовании показателей цитокинового статуса (табл. 1) содержание TNF α и IL-1 β в сыворотке крови больных лимфомами имело тенденцию к повышению. Группу больных лимфома-

ми на $44,7 \pm 8,07\%$ (ТМФ; $p = 0,03$) и $50,0 \pm 7,72\%$ (ТМФ; $p = 0,02$) составляли лица с содержанием TNF α и IL-1 β соответственно ниже порогового значения нормы – 5 пг/мл, что достоверно отличало эту выборку от группы контроля. Этот факт указывает на наличие дефекта в секреции провоспалительных цитокинов и у больных лимфомами.

Анализ содержания цитокинов в сыворотке крови больных ЛПЗ выявил статистически значимое различие, в сравнении с контролем, по содержанию TNF α . В группе больных без общих симптомов медиана и интерквартильный размах составили 6,7 пг/мл (от 0 до 20,7 пг/мл), а при наличии симптомов общей интоксикации – 13,2 пг/мл (от 0 до 108,0 пг/мл) (U; $p < 0,05$). Достоверных межгрупповых различий по содержанию IL-1 β и IL-4 зафиксировано не было, но прослеживалась тенденция к снижению их концентрации у больных В-симптомами. Факт снижения цитокинпродуцирующей активности лейкоцитов подтверждает статистически значимое повышение РТМЛ, стимулированной ФГА, в 2,8 (U; $p = 0,02$) и 3,1 раза (U; $p = 0,012$) как у больных без интоксикации, так и с симптомами интоксикации соответственно.

Обсуждение

Таким образом, наличие симптомов общей интоксикации у больных ЛПЗ сопровождается более глубокими изменениями в иммунном статусе. Контингент больных с явлениями интоксикации является группой риска по развитию инфекционных осложнений и нуждается в более пристальном внимании и адекватной иммунокоррекции.

Изучение содержания острофазного белка лактоферрина в сыворотке крови показало, что у $50,0 \pm 11,18\%$ больных меланомой и у $62,5 \pm 7,65\%$ больных ЛПЗ, этот показатель был повышен. Содержание лактоферрина в группе больных меланомой составило: медиана – 1025,0 нг/мл, интерквартильный размах от 587,5 до 1702,25 нг/мл; у больных лимфомами 1648,0 нг/мл, с интерквартильным размахом от 590,0 до 2550,0 нг/мл. Статистически значимых различий между группами выявлено не было. Также нами отмечено, что в группе больных меланомой после радикального лечения содержание лактоферрина было в пределах нормальных значений (медиана – 745,0 нг/мл, интерквартильный размах от 550,0 до 1121,0 нг/мл). В группе больных с генерализацией процесса наблюдалась тенденция к его повышению до 1390,0 нг/мл (от 745,0 до 2300,0 нг/мл). Содержание лактоферрина в сыворотке крови больных ЛПЗ без общих симптомов интоксикации составило 1285,0 нг/мл с интерквартильным размахом от 570,0 до 1919,0 нг/мл. Прослеживалась тенденция к росту этого показателя при наличии В-симптомов до 1606,0 нг/мл с размахом от 600,0 до 2750,0 нг/мл. При

выявлении корреляционных связей выявлена сильная отрицательная ассоциация между содержанием лактоферрина и IL-1 β у больных с генерализацией меланомы и при ЛПЗ с В-симптомами – $r_s = -0,8$ ($p < 0,05$).

Таким образом, о снижении цитокинпродуцирующей активности лейкоцитов как у радикально пролеченных больных меланомой, так и при прогрессировании злокачественного процесса свидетельствует статистически значимое повышение РТМЛ, стимулированной ФГА. Анализ содержания цитокинов в сыворотке крови больных меланомой выявил достоверное снижение содержания одного из ключевых провоспалительных цитокинов – IL-1 β . Кроме того, среди всех обследованных больных меланомой и ЛПЗ преобладали лица с крайне низким содержанием TNF α и IL-1 β . Дефицит выработки провоспалительных цитокинов является предпосылкой для формирования неполноценного иммунного ответа. В то же время содержание IL-4, ингибирующего клеточный иммунитет, необходимый для борьбы с вирусами и внутриклеточными микроорганизмами, у онкологических больных не отличалось от контрольной группы. Низкое содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α , наиболее выраженное у больных с генерализацией меланомы и больных ЛПЗ с В-симптомами на фоне нормального содержания IL-4, указывало на нарушение формирования полноценного иммунного ответа по Th1-типу с преобладанием ответа по Th2-типу, который недостаточно эффективен в противоинойфекционной защите. Эти больные составляют группу риска по развитию осложнений, в первую очередь, инфекционных.

Результаты наших исследований показали возможность выделения групп больных с отсутствием адекватной выработки провоспалительных цитокинов, что имеет важное диагностическое и прогностическое значение при оценке развития иммунного ответа, в первую очередь, на инфекционные агенты. Выявленная сильная отрицательная корреляционная связь между содержанием лактоферрина и IL-1 β у больных с генерализацией меланомы и при ЛПЗ с В-симптомами позволяет использовать данный тест в качестве прогностического критерия оценки активности процесса.

Список литературы

1. Абидов М.Т., Калюжин О.В., Нелюбов М.В. Иммунотерапия хронических и острых воспалительных заболеваний // *Terra medica nova*. – 2001. – № 2. – С. 3-5.
2. Баранчук Н.В. Сравнительная оценка показателей иммунитета и иммунофенотипа лимфоидных клеток у больных лимфопролиферативными заболеваниями: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Пермь, 2003. – 20 с.
3. Козлов В.А. Некоторые аспекты проблемы цитокинов // *Цитокины и воспаление*. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 5-8.

4. Лихванцева В.Г. Роль цитокинов в патогенезе и прогнозе увеальной меланомы // *Цитокины и воспаление*. – 2002. – Т. 1, № 4. – С. 27-33.

5. Насонов Е.Л. Современные направления иммунологических исследований при хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваниях человека // *Терапевт. арх.* – 2001. – № 8. – С. 43-46.

6. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.

7. Серебряная Н.Б., Новик А.А., Волошин С.В., Новицкий А.В. Клиническое значение некоторых цитокинов при злокачественных неходжкинских лимфомах // *Цитокины и воспаление*. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 21-26.

8. Фрадкин С.З., Залуцкий И.В. Меланома кожи: Практ. пособие для врачей. – Мн.: Беларусь, 2000. – 221 с.

9. Hwang S.A., Wilk K.M., Bangale Y.A., Kruzel M.L., Actor J.K. Lactoferrin modulation of IL 12 and IL 10 response from activated murine leukocytes // *Med. Microbiol. Immunol.* – 2007. – Vol. 196, N 3. – P. 171-180.

10. Jabuulonska E., Kiluk M., Markiewicz W., Jabuulonski J. Priming effects of GM-CSF, IFN-gamma and TNFalpha on human neutrophil inflammatory cytokine production // *Melanoma Res.* – 2002. – Vol. 12, N 2. – P. 123-128.

11. Kowalczyk A., Wiecek A., Franek E., Kokot F. Plasma concentration of leptin, neuropeptide Y and tumor necrosis factor alpha in patients with cancers, before and after radio- and chemotherapy // *Pol. Arch. Med. Wewn.* – 2001. – Vol. 106, N 2. – P. 657-668.

12. Lauerova L., Dusek L., Simickova M., Kocák I., Vagundová M., Zaloudík J., Kovarik J. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response // *Neoplasma*. – 2002. – Vol. 49, N 3. – P. 159-166.

13. Reynolds G.M., Billingham L.J., Gray L.J., Flavell J.R., Najafipour S., Crocker J., Nelson P., Young L.S., Murray P.G. Interleukin-6 expression by Hodgkin/Reed-Sternberg cells is associated with the presence of 'B' symptoms and failure to achieve complete remission in patients with advanced Hodgkin's disease // *Br. J. Haematol.* – 2002. – Vol. 118, N 1. – P. 195-201.

14. Slifka M.K., Whitton J.L. Clinical implications of dysregulated cytokine production // *J. Mol. Med.* – 2000. – Vol. 78, N 2. – P. 74-80.

15. Villani F., Viola G., Vismara C., Laffranchi A., Di Russo A., Viviani S., Bonfante V. Lung function and serum concentrations of different cytokines in patients submitted to radiotherapy and intermediate/high dose chemotherapy for Hodgkin's disease // *Anticancer Res.* – 2002. – Vol. 22, N 4. – P. 2403-2408.

поступила в редакцию 15.04.2007
принята к печати 09.06.2007