

УДК 571.27; 616 – 006.5; 616 – 006.6; 618.14

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ИММУНИТЕТА ПРИ ОПУХОЛЯХ ТЕЛА МАТКИ

© 2010 г.

*К.А. Коровушкина*¹, *А.А. Бабаев*², *Т.В. Котельникова*¹,
*Е.Ю. Конторщикова*¹, *Д.И. Князев*², *Д.В. Новиков*², *Н.Б. Преснякова*³,
*А.Ю. Барышников*⁴, *В.В. Новиков*²

¹Нижегородская государственная медицинская академия

²Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

³Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.И. Блохиной

⁴Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

mbre@mail.ru

Поступила в редакцию 07.04.2010

При раке эндометрия увеличена сывороточная концентрация IL-10 и растворимых комплексов молекул адгезии CD18-CD54. Содержание CD8⁺, CD25⁺, CD38⁺ и CD54⁺ мононуклеарных клеток, IL-12, IFN-γ, растворимых молекул CD8, олигомерных молекул CD50, растворимых молекул CD54 увеличивались при раке эндометрия и миоме матки. Количество CD18⁺ и CD50⁺ мононуклеарных клеток повышалось только при миоме матки.

Ключевые слова: растворимые дифференцировочные молекулы, олигомерные растворимые дифференцировочные антигены, цитокины, миома матки, рак эндометрия.

В механизмах реализации иммунологического ответа участвуют белки иммунокомпетентных клеток, называемые дифференцировочными молекулами и находящиеся как в мембранной, так и в растворимой форме. Нарушение их содержания приводит к модуляции межклеточных взаимодействий и, соответственно, иммунного ответа [1]. Кроме того, сохранение способности растворимыми дифференцировочными молекулами связывать лиганд, характерный для их мембранных форм, приводит к образованию растворимых комплексов (ассоциатов). Эффекторное свойство молекул в составе подобных ассоциатов взаимно погашены. Ранее авторами были выявлены в крови здоровых лиц и при различных заболеваниях три таких растворимых комплекса, состоящих из молекул HLA I класса и молекул CD8, молекул CD54 и CD18, а также из молекул CD18 и CD50 соответственно [2–4].

Было обнаружено, что сывороточное содержание растворимых дифференцировочных молекул, молекул главного комплекса гистосовместимости, а также содержание выявленных комплексов меняется при различных заболеваниях [1, 3–5]. При этом характер изменения концентрации ассоциатов может существенно отличаться как по величине, так и по направленности изменений концентрации суммарных фракций растворимых дифференцировочных молекул [6].

Цель настоящей работы – сравнительная оценка структурно-функционального состояния

пула растворимых дифференцировочных молекул периферической крови больных раком эндометрия и миомой матки в сопоставлении с цитокиновым статусом и популяционным составом мононуклеарных клеток крови.

Материалы и методы

В работе использованы образцы венозной крови пациенток с гистологически подтвержденным диагнозом I стадии рака эндометрия (I патогенетический вариант) (20 человек) и миомы матки (40 человек). Образцы крови были получены от больных, поступивших на лечение в Нижегородскую областную клиническую больницу им. Н.А. Семашко. Возраст больных со злокачественными новообразованиями составил от 39 до 79 лет (в среднем 59 лет), с доброкачественными опухолями – от 30 до 59 (в среднем 46.4 лет). В качестве контрольной группы исследовали кровь 30 клинически здоровых доноров сопоставимого возраста.

Мононуклеарные клетки выделяли в одноступенчатом градиенте плотности фиколлаверографина (1.077 мг/мл). Клетки выделяли не позднее двух часов после забора крови.

Имунофенотипирование мононуклеарных клеток периферической крови проводили методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью люминесцентного микроскопа *Olympus CX31* (Япония). Для иммунофенотипирования мононуклеарных клеток использовали моно-

клональные антитела МКА серии ИКО против CD4, CD8, CD18, CD25, CD38, CD50, CD54, CD95 и HLA I антигенов.

Определение уровня растворимых дифференцировочных молекул CD8, CD25, CD38, CD50, CD54, CD18, олигомерных фракций растворимых CD8, CD25, CD38 и CD54 молекул, ассоциатов CD18–CD50 и CD18–CD54 в сыворотке крови больных проводили двухсайтовым иммуноферментным методом с использованием тех же моноклональных антител (МКА) серии ИКО, меченых пероксидазой хрена, и поликлональных антител против мононуклеарных клеток периферической крови человека в соответствии с ранее разработанными методами. Результаты выражали в условных единицах (U/ml).

Определение сывороточного содержания интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-10 (IL-10), интерлейкина-12 (IL-12) и интерферона-гамма (IFN γ) проводили двухсайтовым иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест-систем для количественного определения IL-4, IL-10 и IFN γ («Вектор-Бест», Новосибирск) и набора для количественного определения человеческого IL-12+p40 (BIOSOURS, США).

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ *Microsoft Excel, Statistica 6.0*.

Результаты и обсуждение

Уровень IL-10 в сыворотке крови больных миомой матки был достоверно повышен относительно здоровых доноров в 1.4 раза, что составило 10.5 ± 1.0 pg/ml. Больные раком эндометрия характеризовались более выраженным увеличением содержания IL-10. Его концентрация составила 17.0 ± 4.2 pg/ml, что превышало норму в 2.3 раза и в 1.7 раза показатели больных миомой матки (табл. 1).

Статистически значимых изменений в содержании IL-4 не обнаружено как у больных миомой матки, так и у больных раком эндометрия. Повышение уровня IL-12 зарегистрировано как при миоме матки, так и при раке эндометрия в 1.9 и 1.8 раза соответственно. Сходный характер изменений носило увеличение сывороточного содержания IFN γ . Концентрация IFN γ у больных с доброкачественной опухолью матки составила 9.9 ± 2.2 pg/ml, что в 23.6 раза превышало показатели здоровых доноров. Следует отметить, что содержание IFN γ в сыворотке крови данной группы больных коррелировало с содержанием IL-10 ($R = 0.51$, $p < 0.05$). У пациенток со злокачественной опухолью эндометрия концентрация IFN γ была равна 8.25 ± 2.6

pg/ml, что в 19.6 раз превышало норму ($p < 0.05$) (табл. 1).

Наряду с исследованием сывороточного содержания цитокинов в двух группах больных было исследовано содержание ряда растворимых дифференцировочных молекул.

В сыворотке крови больных миомой матки наблюдалось увеличение по сравнению с нормой содержания суммарной и олигомерной фракций растворимых молекул CD8 в 1.6 раза, что составило 272.8 ± 20.1 и 224.9 ± 18.6 U/ml соответственно (рис. 1). Увеличение содержания обеих фракций растворимых молекул CD8 у больных с доброкачественной опухолью матки отмечалось совместно с повышением относительного содержания CD8⁺ мононуклеарных клеток периферической крови в 1.4 раза относительно здоровых доноров и составило $30.2 \pm 1.4\%$ (табл. 2).

У больных раком эндометрия на фоне достоверного увеличения относительной концентрации CD8⁺ клеток в 1.3 раза ($28.0 \pm 2.0\%$), также наблюдалось увеличение сывороточных уровней суммарной и олигомерной фракций молекул CD8 в 1.3 и 1.9 раза соответственно (рис. 1). При этом относительное содержание CD8⁺ мононуклеарных клеток коррелировало с сывороточным уровнем IFN γ ($r = 0.78$, $p < 0.05$).

Сывороточный уровень суммарной фракции растворимых молекул CD38 существенно не отличался от нормы как у больных миомой матки, так и раком эндометрия, имея лишь тенденцию к увеличению. Относительная концентрация растворимых молекул CD38 составляла 297.9 ± 34.6 и 225.3 ± 21.5 U/ml соответственно (рис. 2). Обнаружена корреляция между сывороточным содержанием растворимых молекул CD38 и IL-10 ($r = 0.57$, $p < 0.05$).

Содержание олигомерной фракции молекул CD38 не изменялось у больных обеих групп. Однако в крови как женщин с миомой матки, так и женщин, больных раком эндометрия, выявлено увеличение относительного содержания CD38⁺ мононуклеарных клеток, которое повышалось в сравнении с показателями здоровых волонтеров соответственно в 2.5 и 1.3 раза ($p < 0.05$). Заметим, что уровень CD38⁺ клеток у больных миомой матки в 1.9 раз превышал относительное содержание данных клеток в периферической крови больных раком эндометрия ($p < 0.05$) (табл. 2).

У больных с доброкачественной и злокачественной опухолью тела матки на фоне нормального содержания суммарной и олигомерной фракций молекул CD25 было зарегистрировано увеличение относительного содержания

CD25⁺ мононуклеарных клеток периферической крови (рис. 2, табл. 2). Относительное содержание CD25⁺ клеток у больных миомой матки составило 32.3±2.3%, у больных раком эндометрия – 26.1±2.8%, что превышало показатели нормы в 2.1 и 1.7 раза соответственно. При этом относительная концентрация данной популяции клеток у больных миомой матки была в 1.2 раза выше уровня CD25⁺ мононуклеарных клеток в периферической крови больных раком эндометрия ($p < 0.05$).

Исследовано сывороточное содержание растворимых молекул адгезии. У больных миомой матки сывороточное содержание суммарной фракции растворимых молекул CD54 было повышено по сравнению с нормой в 2.1 раза при неизменном содержании олигомерной фракции молекул CD54 и увеличении в 1.7 раза относительного содержания CD54⁺ клеток крови (40.0±3.0%) (рис. 3, табл. 2). У больных раком эндометрия уровень sCD54 был повышен относительно нормы в 2.2 раза. Сывороточное содержание олигомерной фракции молекул CD54 оставалось в пределах нормы, имея лишь тенденцию к увеличению. При этом относительное содержание клеток крови, положительных по CD54 антигену у больных злокачественной опухолью эндометрия, оставалось в пределах нормы. В данной группе больных обнаружена положительная корреляционная взаимосвязь между сывороточным содержанием IL-4 и суммарной фракции растворимых молекул CD54 ($R = 0.74, p < 0.05$), а также между IL-4 и содержанием олигомерного CD54 ($R = 0.65, p < 0.05$).

Сывороточный уровень растворимых молекул CD18 не отличался от нормы как у больных миомой матки, так и раком эндометрия, составляя 189.5±24.8 и 237.6±19.3 U/ml соответственно (рис. 3). При этом в крови больных миомой матки выявлено достоверное увеличение относительного содержания CD18-положительных лимфоцитов, которое повышалось в 1.6 раза в сравнении с нормой. Относительное содержание CD18⁺ мононуклеарных клеток у больных раком эндометрия сохранялось в пределах нормы и было в 1.3 раза ниже относительного содержания данных клеток в периферической крови больных миомой матки ($p < 0.05$) (табл. 2). У больных миомой матки уровень суммарной фракции растворимых молекул CD18 положительно коррелировал с содержанием IL-10 ($R = 0.57, p < 0.05$) и IFN γ ($R = 0.64, p < 0.05$), в то время как у больных со злокачественной опухолью эндометрия содержание растворимых молекул CD18, как и содержание CD18⁺ мононуклеарных клеток положительно коррелировало с концентрацией IL-10.

Наряду с оценкой содержания суммарных фракций дифференцировочных молекул адгезии CD54 и CD18, был определен сывороточный уровень растворимых ассоциатов CD18–CD54. Обнаружено, что при миоме матки он не изменялся, а при раке эндометрия его уровень увеличивался в 1.8 раза. Больные миомой матки и раком эндометрия характеризовались статистически достоверными различиями в содержании растворимых ассоциатов CD18–CD54 ($p < 0.05$) (рис. 4). При этом у больных миомой матки содержание ассоциатов коррелировало с концентрацией IL-10 ($R = 0.57, p < 0.05$) и IFN γ ($R = 0.64, p < 0.05$). При злокачественной опухоли эндометрия сывороточный уровень комплексов CD18–CD54 положительно коррелировал с концентрацией IL-4 ($R = 0.68, p < 0.05$).

Сывороточный уровень суммарной фракции молекул адгезии CD50 у женщин с доброкачественной опухолью матки был достоверно увеличен в 3.1 раза по сравнению с нормой (178.4±48.3 U/ml) и коррелировал с концентрацией IFN γ ($R = 0.61, p < 0.05$). Сывороточное содержание молекул CD50 у женщин, больных раком эндометрия, находилось в пределах нормальных значений (65.4±8.6 U/ml). При этом уровень растворимых молекул CD50 в сыворотке крови таких больных был в 2.7 раза ниже, чем у больных миомой матки (рис. 3). Как в первом, так и во втором случае обнаружено статистически достоверное повышение относительного содержания CD50⁺ мононуклеарных клеток. При миоме матки оно было повышено в 2.2 раза, при раке эндометрия – в 1.5 раза ($p < 0.05$). Различий в содержании CD50⁺ клеток у больных с доброкачественной и злокачественной патологией не выявлено ($p < 0.05$) (табл. 2).

Уровень ассоциатов CD18–CD50 в сыворотке крови как больных миомой матки, так и раком эндометрия не обнаруживал статистически достоверных изменений в сравнении с нормой. Однако при миоме матки была выявлена значительная тенденция к увеличению этого показателя, характеризующаяся большим разбросом данных и коррелирующая с содержанием в сыворотке крови IFN γ ($R = 0.6, p < 0.05$) (рис. 4). Несмотря на отсутствие достоверных изменений в содержании CD18–CD50 комплексов у больных раком эндометрия, была выявлена связь между данным показателем и концентрацией IL-4 ($R = 0.68, p < 0.05$).

Как следует из представленных данных, характер изменения сывороточного уровня растворимых форм мембранных антигенов и цитокинов различается при доброкачествен-

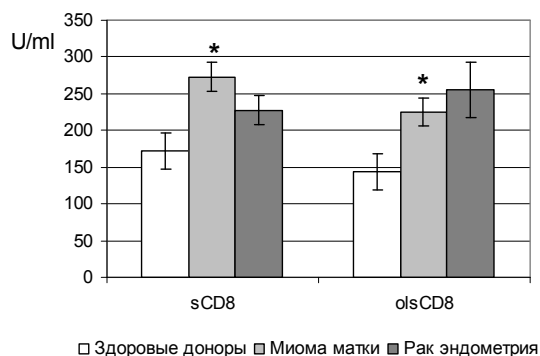


Рис. 1. Содержание растворимых молекул CD8 в сыворотке крови больных миомой матки и раком эндометрия; * – статистически значимые различия с нормой ($p < 0.05$)

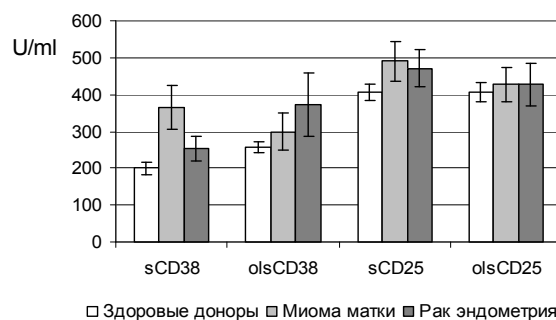


Рис. 2. Содержание растворимых дифференцировочных молекул в сыворотке крови больных миомой матки и раком эндометрия

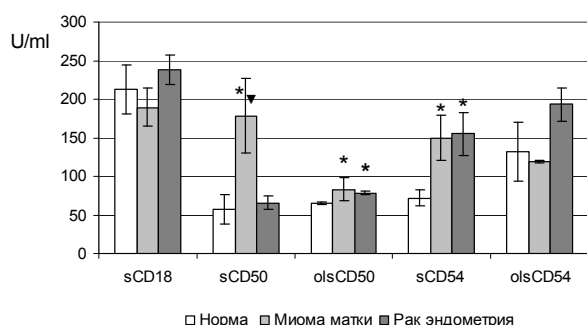


Рис. 3. Содержание растворимых форм молекул адгезии в сыворотке крови больных миомой матки и раком эндометрия; * – статистически значимые различия с нормой ($p < 0.05$); ▼ – статистически значимые различия между миомой матки и раком эндометрия ($p < 0.05$)

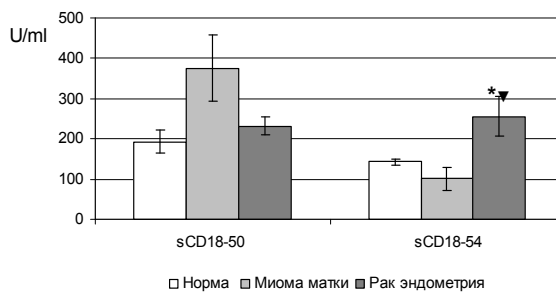


Рис. 4. Содержание растворимых комплексов молекул адгезии в сыворотке крови больных миомой матки и раком эндометрия; * – статистически значимые различия с нормой ($p < 0.05$); ▼ – статистически значимые различия между миомой матки и раком эндометрия ($p < 0.05$)

ных и злокачественных новообразований матки. Так, концентрация IL-10 по сравнению с нормой увеличивалась только у больных раком эндометрия, при миоме она оставалась в пределах нормы. Схожим образом изменялся сывороточный уровень растворимых комплексов CD18–CD54, при миоме он оставался в пределах нормы, а при раке эндометрия увеличивался почти вдвое. Кроме того, при раке эндометрия снижалось относительное содержание HLA I⁺ мононуклеарных клеток. Падение относительного содержания таких клеток крови у больных раком эндометрия отражает снижение плотности экспрессии молекул HLA I класса в условиях иммунодефицита, развивающегося на фоне злокачественного неопластического процесса.

Концентрация IL-12 и IFN- γ увеличивалась как при раке эндометрия, так и при миоме матки. Сходным образом менялось сывороточное содержание суммарной и олигомерной фракций растворимых молекул CD8, олигомерной фор-

мы молекул CD50 и суммарной фракции растворимых молекул CD54. Кроме того, выявлено повышение относительного содержания CD8⁺, CD25⁺, CD38⁺ и CD54⁺ мононуклеарных клеток. Однако относительное содержание CD18⁺ и CD50⁺ мононуклеарных клеток повышалось только при миоме матки.

Между сывороточным уровнем растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы и концентрацией цитокинов обнаружен ряд корреляционных взаимосвязей. При миоме матки отсутствовали корреляционные связи между сывороточным содержанием растворимых дифференцировочных молекул и концентрацией IL-4. Однако обнаруживались связи между сывороточным уровнем суммарных и олигомерных фракций молекул адгезии, а также их комплексов, и содержанием IFN γ и IL-10. При раке эндометрия корреляции между сывороточным уровнем растворимых молекул адгезии и IFN γ отсутствовали. Обнаруживались лишь корреляции между сывороточным содер-

Таблица 1

Сывороточное содержание цитокинов у больных миомой матки и раком эндометрия (pg/ml)

Цитокин	Норма	Миома	Рак эндометрия
IL-4	0.89±0.33	1.94±0.36	2.79±1.08
IL-10	7.31±1.27	10.15±1.00	16.99±4.18*▼
IL-12	59.22±1.44	112.7±2.95*	105.01±17.94*
IFN γ	0.42±0.42	9.91±2.22*	8.25±2.63*

* Статистически значимые различия с нормой ($p < 0.05$),▼ статистически значимые различия между миомой матки и раком эндометрия ($p < 0.05$).

Таблица 2

Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов у больных миомой матки и раком эндометрия (%)

Антиген-положительные клетки	Норма	Миома	Рак эндометрия
CD4 ⁺	37.2±1.4	37.0±1.4	33.6±1.5
CD8 ⁺	21.2±0.5	30.2±1.4*	28.0±2.0*
HLA I ⁺	54.8±1.9	51.0±3.7	43.2±6.2*
CD18 ⁺	32.9±2.1	47.9±2.7*▼	37.34±2.8
CD50 ⁺	27.4±1.3	42.24±2.4*	33.2±3.4
CD54 ⁺	23.2±0.9	42.5±3.0*	33.5±4.4*
CD25 ⁺	15.5±0.9	32.31±2.3*▼	26.14±2.8*
CD38 ⁺	15.7±0.9	39.9±2.9*▼	20.1±1.5*
CD95 ⁺	39.5±1.9	45.0±2.2	34.3±3.5

См. примечания под табл. 1.

жанием растворимых молекул адгезии и концентрацией IL-4 и IL-10, отражающих состояние Th2 звена иммунитета.

Заметим, что сывороточное содержание суммарной и олигомерной фракции растворимых молекул CD50 коррелировало с концентрацией IFN γ только при миоме матки, а содержание суммарной и олигомерной фракций растворимых молекул CD54 коррелировало с концентрацией IL-4 только при раке эндометрия. Сывороточное содержание растворимых дифференцировочных молекул CD18 обнаруживало статистически значимую связь с содержанием IL-10 как при миоме матки, так и при раке эндометрия. В то же время сывороточные уровни растворимых ассоциатов CD18–CD54 и CD18–CD50 коррелировали с концентрацией IFN γ у больных миомой матки и с концентрацией IL-4 у больных раком эндометрия.

Таким образом, имеются различия в состоянии пула растворимых дифференцировочных молекул периферической крови больных миомой матки и раком эндометрия, ассоциированные с цитокиновым статусом больных.

Исследования выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 08-04-97099), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», (ПЗ06 от 24.07.2009) и Научно-технической программы правительства г. Москвы «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний».

Список литературы

- Новиков В.В., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы // Иммунология. 2007. № 4. С. 249–252.
- Бабаев А.А., Ятманова Т.А., Кравченко Г.А., Новиков В.В. Обнаружение растворимых комплексов молекул адгезии в сыворотке крови человека и их уровень у больных острым гепатитом В // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. 2006. Вып. 1. № 11. С. 128–132.
- Новиков В.В., Бабаев А.А., Кравченко Г.А. и др. Растворимые ассоциаты молекул адгезии CD54 и CD18 в сыворотке крови человека // Иммунология. 2008. № 4. С. 220–223.
- Новиков В.В., Гостюжова Е.А., Караулов А.В. и др. Состояние пула растворимых форм мембран-

ных антигенов клеток иммунной системы при острых лейкозах // Российский иммунологический журнал. 2009. № 2. С. 164–170.

5. Алясова А.В., Варшавская Л.В., Новиков В.В., Барышников А.Ю. Динамика растворимого CD50 антигена у больных раком молочной железы в процессе комплексного лечения // Клиниче-

ская и лабораторная диагностика. 2004. № 3. С. 42–43.

6. Варшавская Л.В., Алясова А.В., Барышников А.Ю., Новиков В.В. Мембранная и растворимая формы CD50 (ICAM-3)-антигена при раке молочной железы // Российский биотерапевтический журнал. 2004. № 2. С. 17–18.

ASSESSMENT OF TUMOR IMMUNITY IN THE BODY OF THE UTERUS

К.А. Korovushkina, А.А. Babaev, Т.В. Kotelnikova, Е.Ю. Kontorshchikova, D.I. Knyazev, D.V. Novikov, N.B. Presnyakova, А.Ю. Baryshnikov, V.V. Novikov

Endometrial cancer patients had higher serum concentrations of IL-10 and adhesion molecule soluble complexes CD18-CD54. The content of CD8⁺, CD25⁺, CD38⁺ and CD54⁺ mononuclear cells, IL-12, IFN- γ , soluble CD8 molecules, oligomeric CD50 molecules and soluble CD54 molecules were elevated in endometrial cancer as well as in uterine myoma. Only uterine myoma patients had higher levels of CD18⁺ and CD50⁺ mononuclear cells.

Keywords: soluble differentiation antigens, oligomeric soluble differentiation antigens, cytokines, uterine myoma, endometrial cancer.