

УДК 616-006: 577.152.34: 57.042.2: 616.018.1-092: 612.017.1

© В. А. Кубышкин, А. И. Крадинов, В. В. Опришко, А. И. Гордиенко, А. А. Бакова, Н. В. Химич, 2009.

## СИСТЕМА ПРОТЕОЛИЗА, АПОПТОЗ И АНТИЭНДОТОКСИНОВЫЙ ИММУНИТЕТ У БОЛЬНЫХ С ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

**В. А. Кубышкин, А. И. Крадинов, В. В. Опришко, А. И. Гордиенко, А. А. Бакова, Н. В. Химич**

*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, кафедра лучевой диагностики и лучевой терапии (зав. кафедрой- профессор А. И. Крадинов), отдел клинической иммунологии ЦНИЛ Крымского государственного медицинского университета им. С. И. Георгиевского, г. Симферополь, А.Р. Крым, Украина.*

### PROTEOLYTIC SYSTEM, APOPTOSIS AND ANTIENDOTOXIN IMMUNITY IN PATIENTS WITH MALIGNANT TUMORS

**V. A. Kubyshkin, A. I. Kradinov, V. V. Opryshko, A. I. Gordienko, A. A. Bakova, N. V. Khimich**

#### SUMMARY

The level of proteinases and their inhibitors, factors of apoptois and antiendotoxin immunity in the blood of 38 patients with malignant tumors of different localization it was studied. Presence of the tumor in the organism results in activation of the proteinase-inhibitory system, reaction of apoptotic factors and disregulation of humoral antiendotoxin immunity. Most intensive in the blood changes trypsin-like activity,  $\alpha$  1-proteinase inhibitor and TNF $\alpha$ . The immune system reacted by increase level of antiendotoxin antibodies, presented by IgG and IgA. The pathogenic mechanisms and role of this changes in the processes of carcinogenesis and reactions of organism on malignant tumors it was discussed.

### СИСТЕМА ПРОТЕОЛІЗА, АПОПТОЗ І АНТИЕНДОТОКСИНОВИЙ ІМУНІТЕТ У ХВОРИХ ІЗ ЗЛОЯКІСНИМИ НОВОУТВОРЕННЯМИ

**В. А. Кубишкін, О. І. Крадинов, В. В. Опришко, А. І. Гордієнко, А. А. Бакова, Н. В. Хіміч**

#### РЕЗЮМЕ

Проведено вивчення стану протеїназ і їх інгібіторів, чинників апоптоза і антиендотоксिनного імунітету в сироватці крові 38 хворих із злоякісними новоутвореннями різної локалізації. Встановлено, що наявність в організмі пухлини приводить до активації показників протеїназ-інгібіторної системи, реакції чинників апоптоза і дисрегуляції гуморального антиендотоксिनного імунітету. Найзначніше в сироватці крові з показників протеоліза підвищувалися трипсиноподобна активність і  $\alpha$  1-інгібітор протеїназ, а серед чинників апоптоза – альфа-фактор некрозу пухлин. Імунна система реагувала збільшенням рівня антиендотоксिनних антитіл, представлених IgG і IgA. Обговорюються патогенетичні механізми участі виявлених змін в процесах канцерогенезу і реакція організму на формування злоякісних новоутворень.

**Ключевые слова:** злокачественные опухоли, протеиназы, ингибиторы протеиназ, апоптоз, антиендотоксिनный иммунитет.

Процесс развития злокачественной опухоли, получивший название канцерогенеза, по существу представляет собой процесс ремоделирования ткани, в котором нормальная ткань в результате нескольких стадий превращений заменяется опухолевой тканью. Этот процесс базируется на ряде генетических изменений, в основе которых лежит активация онкогенов и инактивация генов – супрессоров онкогенеза. Благодаря наличию в организме защитных факторов, которые в норме сбалансированы и

эффективно препятствуют развитию опухолей, возникновение новообразования блокируется на начальных стадиях развития. К системам защиты можно отнести систему ингибиторов протеиназ, апоптоз и иммунную систему.

Считается, что протеиназы участвуют в онкогенезе на этапе разрушения и деградации внеклеточного матрикса, что способствует процессам инвазии и метастазирования опухоли. В разрушении внеклеточного матрикса участвуют как кислые, так

и нейтральные протеиназы, причем наиболее активны катепсины, сериновые и матриксные металлопротеиназы [20]. Действие протеиназ регулируется мощной системой ингибиторов протеиназ, которые при нормальном функционировании тканей эффективно блокируют протеолитическую активность [10].

Основное значение факторов апоптоза в реализации эффектов противоопухолевой защиты заключается в запуске каскада реакций, приводящих к уничтожению мутировавшей клетки. Причем апоптоз вызывается как физиологическими сигналами (связыванием специфических киллерных цитокинов со своими рецепторами), так и различными внутриклеточными повреждениями или неблагоприятными условиями, в частности нарушениями структуры ДНК, нехваткой ростовых факторов, гипоксией и т.д. Уход от апоптоза резко повышает жизнеспособность неопластической клетки, делает ее менее чувствительной к факторам противоопухолевого иммунитета и терапевтическим воздействиям [18, 19].

Не исключено, что неспецифические внутриклеточные протеиназы могут оказывать влияние на специфическую систему внутриклеточных каспаз, которые являются ключевыми ферментами запуска и регуляции процессов апоптоза.

Иммунная система благодаря наличию механизмов противоопухолевой защиты играет важную роль в поддержании противоопухолевого иммунитета. Известно, что у больных с онкологическими заболеваниями часто снижается способность к образованию антител против различных бактериальных, грибковых и вирусных антигенов, а также наблюдается дисиммуноглобулинемия – изменение содержания в сыворотке крови общих иммуноглобулинов одного, двух и даже трех классов [8, 11].

Это может стать основой для формирования у таких пациентов нарушений гуморальных иммунных механизмов, участвующих в нейтрализации и клиренсе эндотоксина (ЭТ). ЭТ является основным структурным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий и относится к числу облигатных компонентов естественной среды обитания человека.

По данным литературы, антиэндотоксиновые антитела (анти-ЭТ-АТ), которые в определенных количествах всегда присутствуют в крови, играют важную роль в нейтрализации биологической активности и клиренсе ЭТ, попадающего по тем или иным причинам во внутреннюю среду организма. Дисфункция гуморального антиэндотоксинового иммунитета может создавать предпосылки для проявления “эндотоксиновой агрессии” - феномена, обусловленного повышенным поступлением ЭТ в

системный кровоток на фоне относительной или абсолютной недостаточности антиэндотоксиновых систем крови [15, 16]. Считается, что индивидуальные уровни анти-ЭТ-антител определяются как генетически детерминированной способностью иммунной системы реагировать на гликолипидные антигены, так и антигенной нагрузкой и иммунореактивностью организма в период наблюдения.

Таким образом, относительное содержание сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов у больных с онкологической патологией, не имеющих очагов острой либо хронической грамотрицательной инфекции, можно рассматривать в качестве интегрального маркера, который, с одной стороны, характеризует протективный потенциал гуморального звена иммунитета по отношению к ЭТ, а с другой - указывает на интенсивность транслокации ЭТ из кишечника и косвенно отражает состояние гастроинтестинального барьера [6]. Однако сведения о состоянии гуморального антиэндотоксинового иммунитета у больных с онкологической патологией представлены лишь фрагментарными исследованиями [7].

Цель работы - сопоставить значение протеолитических, апоптотических и антиэндотоксиновых механизмов при развитии онкопатологии.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Под наблюдением находились больные с онкопатологией, проходившие лечение в отделении радиологии Республиканской клинической больницы им. Семашко и в отделении лучевой терапии Крымского Республиканского онкологического диспансера. Всего обследовано 38 больных с онкопатологией. Для характеристики больных использовали классификацию TNM. Распространенность опухоли и ее точная локализация были уточнены на основе обследования, данных компьютерной томографии, обычного рентгенологического и рентгеномографического исследований. У большинства больных диагноз был гистологически верифицирован. Возраст основной массы больных был в пределах 50-70 лет.

Больные были распределены на группы в зависимости от пораженного органа. Наибольшее число пациентов были с опухолями T2-T3 области головы и шеи и шейки матки. T1 был только у больных с опухолью матки, T4 – только с опухолью молочной железы. Контрольную группу составили 14 здоровых людей.

Материалом исследования служила сыворотка крови больных с онкопатологией, полученная в начале курса лучевой терапии. Кровь для исследований получали из локтевой вены. Сыворотку крови получали из нестабилизированной крови путем центрифугирования в течение 15 минут при

3 000 об/мин после предварительного охлаждения.

Определение трипсиноподобной активности (ТПА) проводили на основании измерения скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина (БА) от синтетического субстрата этилового эфира N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Reanal) [9]. Определение эластазоподобной активности (ЭПА) проводили по изучению скорости гидролиза синтетического субстрата N-t-вос-аланил-n-нитрофенилового эфира (БАНФЭ) [1]. Концентрацию альфа-1-ингибитора протеиназ ( $\alpha_1$ -ИП) проводили на основании торможения расщепления трипсином белковых и низкомолекулярных субстратов этилового эфира N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Reanal) [12].

При определении активности кислотостабильных ингибиторов (КСИ) предварительная подготовка сыворотки крови заключалась в ее прогревании при кислых значениях pH для полной инактивации лабильных ингибиторов. Для этого сыворотку, предварительно разбавленную цитратным буфер до pH 4,1 прогревали в течение 30 мин при 60°C. Дальнейшее определение проводили, как описано для  $\alpha_1$ -ингибитора протеиназ [12].

Из показателей апоптоза для определения были выбраны три ключевых компонента, которые участвуют в формировании апоптотической реакции на разных этапах ее развития. Фактор некроза опухолей- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) является цитокином, который проявляет цитотоксичность путем активации соответствующих рецепторов на поверхности опухолевых клеток. Каспаза 8 является ферментом каспазного каскада индукции апоптоза при его запуске через TNF- $\alpha$  или CD95. При этом каспаза 8 во многом объединяет внутренний и внешний пути активации апоптоза. Ген p53 – наиболее часто мутирующий ген, который прямо связан с опухолевым ростом у человека. p53 протеин регулирует пролиферацию и процессы старения клетки и непосредственно участвует в регуляции апоптоза.

Определение перечисленных выше компонентов апоптоза осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием соответствующих коммерческих тест-систем.

TNF- $\alpha$  определяли с помощью иммуноферментного набора «Вектор-БЕСТ» (Россия), основным реагентом которого являются моноклональные антитела к TNF- $\alpha$  человека. По данным производителя данного набора, средняя концентрация TNF- $\alpha$  в сыворотке крови человека составляет 0,5 пг/мл с колебаниями от 0 до 5,9 пг/мл.

По нашим данным, концентрация TNF- $\alpha$  в крови здоровых лиц составила  $0,21 \pm 0,16$  пг/мл. Каспазу 8 определяли с помощью иммуноферментного набора «Bender MedSystems» (Австрия). По данным производителя, содержание каспазы 8 в сыворотке крови составляет от 0 до 1,20 нг/мл. По нашим

данным, каспаза 8 не определялась в сыворотке крови 83 % лиц контрольной группы, а ее средние значения составили  $0,048 \pm 0,039$  нг/мл. p53 определяли с использованием иммуноферментного набора фирмы «Bender MedSystems» (Австрия). По данным производителя, p53 в сыворотке крови здоровых лиц как правило не определяется, но при некоторых ситуациях может появляться. По нашим данным, в сыворотке крови 67 % лиц контрольной группы p53 не выявлялся, а его среднее значение в контрольной группе составило  $1,20 \pm 0,63$  U/мл.

Анти-ЭТ-антитела классов А, М и G (соответственно анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, применяя протоколы, разработанные в лаборатории клинической иммунологии ЦНИЛ Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского.

В качестве антигена использовали коммерческий препарат липополисахарида *E. coli* K235 (Sigma Chem. Co., USA). Уровни анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG выражали в условных единицах оптической плотности для разведения тестируемой сыворотки крови 1:50 [4].

Содержание общих иммуноглобулинов классов А, М и G (соответственно IgA, IgM и IgG) в сыворотке крови определяли микротурбидиметрическим методом [5].

Статистическая обработка полученных данных проведена методами вариационной статистики с вычислением средних величин (M) и оценкой вероятности расхождений (m). В качестве критерия при оценке достоверности наблюдаемых изменений соответствующих показателей использовали t-критерий Стьюдента. За достоверную принималась разность средних значений при  $p < 0,05$ . Статистические расчеты выполняли в среде электронных таблиц Excel для Microsoft Office.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что у больных с злокачественными новообразованиями наблюдались изменения показателей всех трех изученных систем. Среди показателей протеиназ-ингибиторной системы наиболее существенно увеличивалась активность трипсиноподобных протеиназ и альфа-1-ингибитора протеиназ (Табл. 1).

Степень увеличения трипсиноподобной активности зависела от органа и ткани, в котором развивалась опухоль. При опухоли тела матки и легких увеличение ТПА составляло 60%, при опухоли молочной железы активность трипсиноподобных протеиназ увеличивалась на 87% ( $p < 0,01$ ), опухоль шейки матки приводила к увеличению ТПА более чем в 2 раза ( $p < 0,05$ ). Развитие опухоли в области головы и шеи увеличивало трипсиноподобную

активность более, чем в 3 раза ( $p < 0,001$ ). Менее динамично на развитие опухолевого процесса реагировала активность эластазоподобных протеиназ. При формировании опухоли молочной

железы, тела матки и области головы и шеи отмечалась некоторая тенденция к увеличению ЭПА, а при опухоли шейки матки и легких отмечалась тенденция к снижению ЭПА.

Таблица №1

Изменения протеиназо-ингибиторной системы сыворотки крови больных с опухолями, ( $M \pm m$ )

Группы больных	Показатели			
	ТПА, (мкмоль/мл·мин)	ЭПА, (нмоль/мл·мин)	$\alpha_1$ -ИП, (ИЕ/мл)	КСИ, (ИЕ/мл)
Контроль n = 14	0,220±0,019	196,5±6,5	29,4±0,7	7,74±0,68
Опухоль молочной железы n = 7	0,412±0,019 <sup>***</sup>	209,8±6,2	33,4±2,2	10,28±0,63 <sup>*</sup>
Опухоль матки n = 7	0,353±0,031 <sup>*</sup>	209,5±4,3	39,5±2,3 <sup>*</sup>	11,47±0,54 <sup>**</sup>
Опухоль шейки матки n = 12	0,500±0,048 <sup>*</sup>	172,5±8,2	39,5±2,1 <sup>*</sup>	8,72±0,71
Опухоль легких n = 5	0,358±0,047	168,5±16,5	44,7±4,8	10,46±0,57 <sup>*</sup>
Опухоли головы и шеи n = 7	0,713±0,059 <sup>***</sup>	204,7±7,2	46,9±2,6 <sup>*</sup>	10,16±0,29 <sup>**</sup>

Примечание: Звездочками обозначена достоверность различий по отношению к контролю: одна звездочка –  $p < 0,05$ ; две –  $p < 0,01$ ; три –  $p < 0,001$ .

На фоне описанных изменений активности протеиназ реакция обеих классов ингибиторов заключалась в повышении их активности. Альфа-1-ингибитор протеиназ при опухолях молочной железы проявлял только тенденцию к увеличению, тогда как при опухоли тела и шейки матки отмечено его увеличение на 34% ( $p < 0,05$ ).

Максимальное увеличение активности данного ингибитора на 60 % ( $p < 0,01$ ) отмечено при развитии опухолей головы и шеи. Кислостабильные ингибиторы протеиназ в сыворотке крови повышались при всех формах изученной онкопатологии. При этом наиболее значительное повышение на 48 % ( $p < 0,01$ ) выявлено при опухоли тела матки, хотя и при опухолях легких, а также области головы и шеи отмечено достоверное повышение КСИ. Определенные факторы апоптоза показали, что наиболее

динамичным показателем при опухолях является TNF- $\alpha$  (Табл. 2).

Каспаза 8 не определялась в 65 % исследованных образцов сыворотки крови онкобольных, а р53 - в 46% изученных образцов. Установлено, что концентрация TNF- $\alpha$  достоверно увеличивалась в сыворотке крови у больных с злокачественными опухолями всех изученных локализаций. Наиболее выраженным было повышение уровня TNF- $\alpha$  у больных с опухолями шейки матки и легких. При этом каспаза-8 практически исчезала из сыворотки крови и переставала определяться в трех группах пациентов. Содержание р53 у больных с злокачественными новообразованиями менялось незначительно. Проведенные исследования состояния гуморального антиэндотоксинового иммунитета показали, что у больных с опухолью молочной железы уровень анти-

ЭТ-IgM был в среднем на 36,4% ниже ( $p < 0,05$ ), а анти-ЭТ-IgG – на 41,9% выше ( $p < 0,001$ ) соответствующих

показателей для практически здоровых лиц контрольной группы (Табл.3).

Таблица №2

Изменения показателей апоптоза в сыворотке крови больных с опухолями, ( $M \pm m$ )

Группы больных	Показатели		
	TNF- $\alpha$ , пг/мл	Каспаза – 8, нг/мл	P-53, U/мл
Контроль n = 14	0,21 $\pm$ 0,16	0,048 $\pm$ 0,039	1,20 $\pm$ 0,63
Опухоль молочной железы n = 7	2,17 $\pm$ 0,71 *	0	2,35 $\pm$ 0,53
Опухоль шейки матки n = 12	3,54 $\pm$ 0,83 **	0	0,46 $\pm$ 0,15
Опухоль легких n = 5	3,21 $\pm$ 0,63 ***	0,066 $\pm$ 0,039	0,34 $\pm$ 0,16
Опухоли головы и шеи n = 7	3,21 $\pm$ 0,74 *	0	3,75 $\pm$ 1,15

Примечание: Звездочками обозначена достоверность различий по отношению к контролю: одна звездочка –  $p < 0,05$ ; две -  $p < 0,01$ ; три -  $p < 0,001$ .

У больных с опухолью матки средние уровни анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgG превышали нормативные величины соответственно на 44,4% ( $p < 0,01$ ) и 93,6% ( $p < 0,001$ ), тогда как уровень анти-ЭТ-IgM был в среднем на 36,4% ниже нормального значения данного показателя ( $p < 0,05$ ).

У больных с опухолью шейки матки по сравнению с контрольной группой содержание анти-ЭТ-IgG было повышено в среднем на 80,7% ( $p < 0,01$ ), тогда как уровень анти-ЭТ-IgM был понижен в среднем на 40,9% ( $p < 0,05$ ).

У больных с опухолью легких уровень анти-ЭТ-IgA был в среднем на 133,3% выше ( $p < 0,05$ ), а уровень анти-ЭТ-IgM – на 68,2% ниже ( $p < 0,005$ ) соответствующих нормативных показателей. У больных с опухолями области головы и шеи на фоне практически нормального содержания анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG уровень анти-ЭТ-IgA был в среднем на 100,0% выше ( $p < 0,05$ ), чем у лиц контрольной группы.

Для более полной оценки особенностей иммунного статуса пациентов с опухолями

различной локализации представлялось целесообразным сопоставить показатели, характеризующие не только специфический антиэндотоксиновый иммунитет, но и гуморальное звено иммунитета в целом.

В клинической практике о функциональном состоянии В-системы иммунитета (гуморального иммунитета) принято судить по содержанию в сыворотке крови трех основных классов иммуноглобулинов - IgA, IgM и IgG [13,14].

Проведенные исследования показали, что у больных всех обследованных групп концентрация общего IgG в сыворотке крови в среднем достоверно не отличалась от величины этого показателя в контрольной группе (табл.4).

У больных с опухолью молочной железы и опухолью легких содержание общего IgM было в среднем соответственно на 50,2% ( $p < 0,01$ ) и 47,7% ( $p < 0,001$ ) ниже, чем у лиц контрольной группы. У пациентов с опухолями головы и шеи концентрация общего IgA в сыворотке крови на 40,7% превышала аналогичный нормативный показатель ( $p < 0,01$ ).

Таблица 3

Изменения уровня антиэндотоксиновых антител сыворотки крови больных с опухолями, ( $M \pm m$ )

Группы больных	Показатели		
	Анти-ЭТ-IgA, усл. ед. опт. плотн.	Анти –ЭТ-IgM, усл. ед. опт. плотн.	Анти –ЭТ-IgG, усл. ед. опт. плотн.
Контроль n = 14	0,18±0,01	0,22±0,02	0,31±0,03
Опухоль молочной железы n = 7	0,21±0,03	0,14±0,03 *	0,44±0,03 **
Опухоль матки n = 7	0,26±0,03 **	0,14±0,03 *	0,60±0,07 ***
Опухоль шейки матки n = 12	0,25±0,04	0,13±0,03 **	0,56±0,08 **
Опухоль легких n = 5	0,42±0,10 *	0,07±0,02 ***	0,50±0,19
Опухоли головы и шеи n = 7	0,36±0,06 **	0,15±0,04	0,36±0,05

Примечание: Звездочками обозначена достоверность различий по отношению к контролю: одна звездочка –  $p < 0,05$ ; две –  $p < 0,01$ ; три –  $p < 0,001$ .

Полученные результаты указывают на формирование выраженного дисбаланса в иммунной системе обследованных больных, который проявляется тенденцией к снижению концентрации общего IgM и общего IgG в сыворотке крови. С другой стороны, уровни анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgG в крови у больных опухолями увеличиваются, а содержание анти-ЭТ-IgM имеет тенденцию к снижению. Это может свидетельствовать о реакции иммунной системы на поступление ЭТ во внутреннюю среду организма и нарастании эндотоксемии у больных с злокачественными новообразованиями.

Известно, что ЭТ обладает исключительно высокой биологической активностью и относится к числу наиболее сильных экзогенных модуляторов иммунологической реактивности. При этом за большинство всех физиологических и патофизиологических реакций ЭТ в организме млекопитающих ответственен входящий в состав ЭТ липид А, который в результате взаимодействия со специализированными клеточными рецепторами активирует эффекторные клетки (относящиеся в основном к миеломоноцитарному ряду) и инициирует синтез

ими широкого спектра провоспалительных медиаторов белковой и липидной природы. Посредством этого ЭТ может воздействовать практически на все ткани и системы организма. Ведущую роль в реализации патогенного потенциала ЭТ играют провоспалительные цитокины TNF- $\alpha$  и IL-1  $\beta$ , синтез которых резко усиливается в результате ЭТ-зависимой активации эффекторных клеток [17, 21].

В тоже время у больных с онкологической патологией именно эти цитокины являются, по данным литературы, ключевыми патогенетическими факторами развития так называемой “метаболической иммуносупрессии” - комплекса негативных изменений в иммунной системе, связанных с нарушениями обмена веществ, которые, в свою очередь, формируются вследствие нарастания концентрации опухолевых метаболитов.

Считается, что ранний и устойчивый рост концентрации TNF- $\alpha$  у больных с онкологической патологией обеспечивается как минимум двумя аддитивными механизмами: с одной стороны, при опухолевой прогрессии происходит селекция малигнизированных клеток, обладающих

Таблица 4

Изменения уровня иммуноглобулинов сыворотки крови у больных с опухолями, (M±m)

Группы больных	Показатели		
	IgA, мг/мл	IgM, мг/мл	IgG, мг/мл
Контроль n = 14	2,78±0,30	2,27±0,32	13,76±1,12
Опухоль молочной железы n = 7	3,85±0,63	1,13±0,22 <sup>**</sup>	10,10±1,46 <sup>*</sup>
Опухоль матки n = 7	2,94±0,41	1,76±0,33	11,81±1,72
Опухоль шейки матки n = 12	3,41±0,46	2,04±0,24	16,76±1,39 <sup>*</sup>
Опухоль легких n = 5	3,92±0,49	1,20±0,10 <sup>***</sup>	12,88±3,38
Опухоли головы и шеи n = 7	3,91±0,35 <sup>**</sup>	3,16±0,67	13,94±1,63

Примечание: Звездочками обозначена достоверность различий по отношению к контролю: одна звездочка –  $p < 0,05$ ; две –  $p < 0,01$ ; три –  $p < 0,001$ .

резистентностью к цитотоксическому воздействию TNF- $\alpha$ ; с другой стороны, экспрессируемые опухолевыми клетками антигены индуцируют повышенный синтез TNF- $\alpha$  [3].

Однако учитывая изложенное выше, можно достаточно обоснованно предположить, что по крайней мере у части пациентов с онкологической патологией дополнительным фактором, усугубляющим проявления метаболической иммуносупрессии, может быть ЭТ-зависимая активация клеток моноцитарно-макрофагального ряда, которая инициирует продукцию широкого спектра первичных медиаторов воспаления, включая TNF- $\alpha$  и IL- $\beta$  и ведет к еще большему дисбалансу цитокинового профиля. Системное воздействие на организм TNF- $\alpha$  совместно с IL- $\beta$  и рядом других цитокинов сопровождается развитием продромального синдрома, проявляющегося снижением аппетита, сонливостью, лихорадкой, повышением болевой чувствительности.

Кроме того, экспериментальные данные указывают, что TNF- $\alpha$  и IL- $\beta$  принимают активное участие

в ангиогенезе, играющем ключевую роль при неопластических процессах [2, 3].

Приведенные данные позволяют прийти к заключению, что выявленные изменения компонентов протеиназ-ингибиторной системы крови в целом соответствуют развитию острофазной реакции, соответствующей развитию воспалительного процесса.

Скорее всего, местная активация протеиназ при формировании опухоли усиливает деструктивные процессы в тканях в месте ее локализации, что может способствовать процессам инвазии и метастазирования. Активация протеиназ и их ингибиторов в крови является ответной системной реакцией организма на развитие опухоли, которая направлена на предотвращение процессов инвазии опухолевой ткани. Полученные результаты указывают на формирование выраженного дисбаланса в иммунной системе обследованных больных, который проявляется тенденцией к снижению концентрации общего IgM и общего IgG в сыворотке крови. С другой стороны, уровни анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgG

в крови у больных опухолями увеличиваются, а содержание анти-ЭТ-IgM имеет тенденцию к снижению. Это может свидетельствовать о реакции иммунной системы на поступление ЭТ во внутреннюю среду организма и нарастании эндотоксемии у больных с злокачественными новообразованиями.

Известно, что ЭТ обладает исключительно высокой биологической активностью и относится к числу наиболее сильных экзогенных модуляторов иммунологической реактивности. При этом за большинство всех физиологических и патофизиологических реакций ЭТ в организме млекопитающих ответственен входящий в состав ЭТ липид А, который в результате взаимодействия со специализированными клеточными рецепторами активирует эффекторные клетки (относящиеся в основном к миеломоноцитарному ряду) и инициирует синтез ими широкого спектра провоспалительных медиаторов белковой и липидной природы.

Посредством этого ЭТ может воздействовать практически на все ткани и системы организма. Ведущую роль в реализации патогенного потенциала ЭТ играют провоспалительные цитокины TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , синтез которых резко усиливается в результате ЭТ-зависимой активации эффекторных клеток [17, 21].

В тоже время у больных с онкологической патологией именно эти цитокины являются, по данным литературы, ключевыми патогенетическими факторами развития так называемой “метаболической иммуносупрессии” - комплекса негативных изменений в иммунной системе, связанных с нарушениями обмена веществ, которые, в свою очередь, формируются вследствие нарастания концентрации опухолевых метаболитов.

Считается, что ранний и устойчивый рост концентрации TNF- $\alpha$  у больных с онкологической патологией обеспечивается как минимум двумя аддитивными механизмами: с одной стороны, при опухолевой прогрессии происходит селекция малигнизированных клеток, обладающих резистентностью к цитотоксическому воздействию TNF- $\alpha$ ; с другой стороны, экспрессируемые опухолевыми клетками антигены индуцируют повышенный синтез TNF- $\alpha$  [3].

Однако учитывая изложенное выше, можно достаточно обоснованно предположить, что по крайней мере у части пациентов с онкологической патологией дополнительным фактором, усугубляющим проявления метаболической иммуносупрессии, может быть ЭТ-зависимая активация клеток моноцитарно-макрофагального ряда, которая инициирует продукцию широкого спектра первичных медиаторов воспаления, включая TNF- $\alpha$  и IL-1 $\alpha$  и ведет к еще большему дисбалансу

цитокинового профиля. Системное воздействие на организм TNF- $\alpha$  совместно с IL-1 $\beta$  и рядом других цитокинов сопровождается развитием продромального синдрома, проявляющегося снижением аппетита, сонливостью, лихорадкой, повышением болевой чувствительности.

Кроме того, экспериментальные данные указывают, что TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  принимают активное участие в ангиогенезе, играющем ключевую роль при неопластических процессах [2, 3].

Приведенные данные позволяют прийти к заключению, что выявленные изменения компонентов протеиназ-ингибиторной системы крови в целом соответствуют развитию острофазной реакции, соответствующей развитию воспалительного процесса. Скорее всего, местная активация протеиназ при формировании опухоли усиливает деструктивные процессы в тканях в месте ее локализации, что может способствовать процессам инвазии и метастазирования. Активация протеиназ и их ингибиторов в крови является ответной системной реакцией организма на развитие опухоли, которая направлена на предотвращение процессов инвазии опухолевой ткани.

Учитывая отсутствие в крови существенных изменений в уровне каспазы 8, можно предположить, что активация протеолиза напрямую не затрагивает состояние внутриклеточного каспазного каскада у больных с новообразованиями. Вместе с тем, рост активности протеиназ наблюдается параллельно с возрастанием содержания в крови одного из наиболее мощных провоспалительных цитокинов, а именно TNF- $\alpha$ , что может свидетельствовать об активации как регуляторных, так и эффекторных механизмов регуляции карциногенеза. При этом увеличение синтеза TNF- $\alpha$  позволяет говорить как об активации внешнего пути апоптоза, так и опосредованной цитокинами реакции организма на формирование опухолевого процесса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Оглоблина О.Г., Платонова Л.В., Мясникова Л.В., Лившиц М.Б., Пасхина Т.С. Активность протеиназ гранулоцитов и уровень кислотостабильных ингибиторов протеиназ в бронхоальвеолярном секрете детей с бронхопатиями различной этиологии // Вопросы медицинской химии. - 1980. - №3. - С. 387-392.
2. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Старикова Э.А., Фрейдлин И.С. Цитокиновый контроль процесса ангиогенеза // Медицинская иммунология. - 2003. - 5, №5-6. - С. 493-506
3. Антонов В.Г., Козлов В.К. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы // Цитокины и воспаление. - 2004. - 3, №1. - С. 8-19
4. Гордиенко А.И. Новый подход к повышению специфичности определения антител к липополисахаридам грамотрицательных бактерий



методом твердофазного иммуноферментного анализа // Укр. біохім. журн.- 2004.- 76, №6.- С. 130-135.

5. Гордиенко А.И., Белоглазов В.А. Микротурбидиметрический метод определения IgG, IgM и IgA человека // Имунологія та алергологія. - 2000. - №1. С. 12-15.

6. Гордиенко А.А., Прицуло О.А., Белоглазов В.А., Бакова А.А. и др. Взаимосвязь между уровнями антител к липополисахариду и аутоантител к ДНК у больных вульгарной пузырчаткой // Имунологія та алергологія.- 2002.- №4.- С. 67-72.

7. Гордиенко Ал.И., Гордиенко Ан.И., Исакова Л.М., Дранник Г.Н., Бакова А.А., Химич Н.В. Антиэндотоксиновый иммунитет у больных гемобластозами // Вестник гематологии.- 2008.- IV, №3.- С. 30-35.

8. Гриневич Ю.А., Каменец Л.Я. Основы клинической иммунологии опухолей.- Киев, Здоров'я, 1986.- 160 с.

9. Кринская А.В., Пасхина Т.С. Количественное определение калликреина и калликреиногена в сыворотке (плазме) крови человека // Современные методы биохимии. – М.: Медицина, 1977. - С. 163-170.

10. Кубышкин В.А., Паленая Ю.В., Кубышкин А.В., Опышко В.В. Роль протеиназ-ингибиторной системы в процессах канцерогенеза // Загальна патологія та патологічна фізіологія.- 2007.- №1.- с. 9-16

11. Мельник Е.А., Рыбальская А.П. Иммуноглобулины основных классов в сыворотке крови у больных лейкемией // Лаб. диагностика.- 2007.- 42, №4.- 34.

12. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Унифицированный метод определения активности  $\alpha_1$ -антитрипсина

и  $\alpha_2$ -макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека // Вопросы медицинской химии. - 1979. - № 4.- С. 494-499.

13. Тоголян А.А., Фрейдлин И.С. Возможности иммунологической лабораторной диагностики // Клин. лаб. диагностика.- 1997.- №2.- С. 16-23;

14. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Череев А.Н. Оценка иммунной системы человека: современное состояние вопроса, сложности и достижения // Иммунология.- 1998.- №6.- С. 8-10.

15. Яковлев М.Ю. “Эндотоксиновая агрессия” как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных // Успехи совр. биол.- 2003.- 123, №1.- С. 31-40.

16. Barclay G.R. Endotoxin-core antibodies: time for a reappraisal? // Intensive Care Med.- 1999.- 25, №5.- P. 427-429.

17. Heine H., Rietschel E.T., Ulmer A.J. The biology of endotoxin // Mol. Biotechnol.- 2001.- 19, №3.- P. 279-296.

18. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis (comment). // Nature.- 2000.- 407.- P. 770-776.

19. Kaufmann S.H., Hengartner M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium // Trends Cell Biol.- 2001.- 11.- P. 526-534.

20. Skrzydlewska E., Sulkowska M., Koda M., Sulkowski S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis // World J. Gastroenterol.- 2005.- № 11(9).- P. 1251-1266.

21. Van Amersfoort E.S., Van Berkel T.J., Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock // Clin. Microbiol. Rev.- 2003.- 16, N3.- P. 379-414.