

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е.И. Шишацкая
« ____ » _____ 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Изучения содержания провоспалительных и противовоспалительных
цитокинов при раке желудка

Руководитель

Доктор мед.наук _____ О.В. Смирнова

Выпускник

_____ Н.А. Регнер

Красноярск 2021

Оглавление

Введение.....	3
1 Обзор литературных источников	5
1.1 Этиология рака желудка.....	5
1.2 Патогенез рака желудка	6
1.3 Стадии рака желудка и лечение	9
1.4 Роль цитокинов в онкогенезе	10
2 Материалы и методы	15
2.1 Объект исследования	15
2.2 Иммуноферментный анализ.....	16
2.3 Статистическая обработка данных.....	16
3 Результаты исследования	18
Заключение	21
Список использованных источников	22

Введение

Одним из самых распространенных онкологических заболеваний в мире является рак желудка. Каждый год отмечается более миллиона новых случаев и более 650 тысяч смертей от данной патологии [1, 25]. Высокая смертность обусловлена поздним обнаружением рака желудка, когда сложно подобрать эффективную терапию. На ранних стадиях заболевание протекает практически бессимптомно, что затрудняет диагностику. Отмечается зависимость частоты встречаемости рака желудка от региона проживания. Странами-лидерами по заболеваемости являются Япония, Россия, Корея и Китай [1, 23, 25]. Однако смертность в Японии от данной патологии ниже, что обусловлено успешным скринингом [25].

Одной из основных причин развития рака желудка является инфицирование бактерией *Helicobacter pylori* (HP). К примеру, в Китае, где высок уровень заболеваемости данной онкологией, процент заражённых HP составляет 71,7 % [5, 24]. В соответствии со схемой канцерогенеза, предложенной Корреа, сначала происходит заражение пациента HP. Далее в результате бактериальной жизнедеятельности нарушается слизистая оболочка желудка. Вследствие этого развивается хронический гастрит, который без своевременного лечения переходит в атрофический гастрит. Это состояние переходит в метаплазию, затем в дисплазию и на конечной стадии трансформируется в рак желудка [4].

Основная проблема в борьбе с онкологическими заболеваниями – это защитное действие иммунитета по отношению к опухоли, которое способствует её прогрессии. Данные реакции опосредованы цитокиновым звеном иммунной системы. Цитокины оказывают неоднозначное действие на опухоль. В одних случаях они способны оказывать стимулирующее влияние, а в других ингибирующее по отношению к новообразованию [3]. Цитокины используют для определения пролиферативной активности клеток, что является важным фактором для раннего диагностирования заболевания и подбора эффективной терапии [6].

Таким образом, цель работы: изучить содержание некоторых цитокинов при раке желудка на ранних стадиях.

Задачи исследования:

1. Определить содержание некоторых провоспалительных цитокинов (ФНО-альфа, ИНФ-гамма, ИЛ-2, ИЛ-8) при раке желудка на ранних стадиях;
2. Оценить уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-4 при раке желудка на I-II стадиях;
3. Установить корреляционные взаимосвязи между количественным содержанием цитокинов и стадией заболевания.

1 Обзор литературных источников

1.1 Этиология рака желудка

Рак желудка – это злокачественная опухоль, образующаяся из собственных эпителиальных клеток слизистой оболочки органа. Заболевание является следствием воздействия многих этиологических факторов.

Генетический фактор.

Повышенный риск развития онкологического новообразования связан с полиморфизмами генов ИЛ-10 и ИЛ-17. Данный полиморфизм чаще встречается в азиатской популяции [5]. Эти данные соотносятся с более новыми исследованиями зависимости появления заболевания от региона проживания. По данным World Cancer Research Fund American Institute for Cancer Research, в 2018 году было зарегистрировано более 1 миллиона новых случаев заболевания. Больше всего пациентов регистрируется в Южной Корее, Японии и Китае [1].

Также отмечается корреляция между этнической принадлежностью и заболеваемостью раком желудка. Moore A. было показано на основании систематического анализа 74 исследований, что заболеваемость и смертность от данного типа патологии уменьшилась за последние четыре десятилетия в большинстве стран мира, но темпы роста выросли для некоторых групп коренного населения. Высокие показатели заболеваемости раком желудка наблюдались у коренных жителей Сибири, мапуче в Южной Америке, инуиты в Арктике, в регионах Гренландии, Канады, Аляски и маори в Новой Зеландии [11].

Сопутствующие заболевания желудка.

90 % некардиального рака желудка – это следствие хронического гастрита, ассоциированного с НР. Было показано, что данная бактерия увеличивает вероятность появления заболевания в течение десяти лет от инфицирования [5]. Также было отмечено, что около 10-15% от всех случаев язвенной болезни переходит в рак желудка [17].

Особенности потребляемых веществ.

К данным особенностям можно отнести приём канцерогенных веществ с продуктами питания [18, 19]. Здесь же можно отметить курение, так как через слизистую оболочку ротовой полости и через лёгкие происходит проникновение канцерогенов в организм. Подсчитано, что 11% мировых случаев рака желудка (17% случаев в Европе) приходится на курение. Недавнее исследование показало, что кальян и употребление опиума являются факторами риска развития предраковых поражений и рака желудка [5, 10]. В эту же группу этиологических факторов можно включить так называемую «азиатскую диету». Данная система питания предполагает избыточное потребление поваренной соли. Известно, что она разрушает слизистую оболочку желудка, тем самым приводя к воспалению. Культуры, чей рацион богат солью и маринованными продуктами, такие как японцы, демонстрируют более высокие показатели заболеваемости раком желудка [5, 9, 18].

На основе мета-анализа 10 исследований было показано, что умеренное потребление алкоголя увеличивает риск развития рака желудка на 39% , при злоупотреблении процент возрастает. Однако еще один мета-анализ 44 исследований случай-контроль и 15 когортных исследований показали отсутствие ассоциации между умеренным употреблением алкоголя и риском развития рака желудка. Тем не менее, положительная ассоциация обнаружена при чрезмерном употреблении алкоголя и появлением рака. Алкоголь раздражает стенки желудка и нарушает слизистую оболочку, что в свою очередь приводит к гастриту, который может перейти в рак желудка [5].

Отдельно стоит отметить воздействие физических факторов. Например, ионизирующее излучение оказывает выраженное канцерогенное действие [9].

1.2 Патогенез рака желудка

Вне зависимости от патогенного фактора формирование заболевания происходит по одной схеме, описанной Корреа еще в конце XX века. В соответствии с ней сначала происходит развитие хронического гастрита. То

есть при воздействии внешних факторов происходит воспаление слизистой оболочки желудка. Это состояние в случае отсутствия лечения переходит в атрофическую форму, при которой уже отмечается вырождение париетальных клеток оболочки желудка, ответственных за секрецию соляной кислоты. Атрофия может поражать отдельные участки желудка и весь орган в целом. Исходя из этого выделяют «диффузный» (фундальный, антральный или тотальный), а также «мультифокальный» атрофический гастрит. Слизистая оболочка фундального отдела желудка представлена тремя основными популяциями клеток: добавочными – слизиобразующими, вырабатывающими муцин; париетальными, секретирующими соляную кислоту и главными – продуцирующими пепсины. Атрофия желез заключается в уменьшении численности клеток, продуцирующих пепсины, и париетальных клеток, выделяющих соляную кислоту. Атрофия может затрагивать одну или обе популяции клеток, число которых меняется независимо друг от друга [13]. Атрофия желез тела желудка может компенсироваться за счет увеличения его объема, высоты складок, разрастания слизистой оболочки антрального отдела и появления в составе антральных желез париетальных клеток. Однако такой компенсации может и не быть, и атрофия слизистой оболочки может охватывать весь желудок [13].

Далее это состояние перетекает в метаплазию. Она характеризуется замещением одного типа клеток другим. Причем обратное развитие или переход одного дифференцированного типа клеток в другой при адаптации к изменившимся условиям окружающей среды низковероятны. Пусковая роль принадлежит чаще всего агрессивным штаммам *H. pylori* и ассоциированным с ними воспалением слизистой оболочки желудка [14].

Предраковым состоянием считается следующая стадия – дисплазия. Дисплазия – это термин, определяющий клеточные и структурные изменения эпителия. Затем это состояние переходит в рак желудка [12, 35].

Согласно классификации ВОЗ выделяют несколько групп поражений слизистой оболочки желудка:

1. Нет интраэпителиальной неоплазии/дисплазии — задействованы такие доброкачественные процессы, как воспаление и метаплазия.
2. Неопределённая интраэпителиальная неоплазия/дисплазия - изменения слизистой оболочки желудка, когда у специалиста есть сомнения в опухолевой или неопухоловой природе поражения, особенно при малых объёмах биоптатов.
3. Интраэпителиальная неоплазия/дисплазия — предраковое эпителиальное поражение с эпителиальной клеточной и архитектурной атипией, но без очевидного инвазивного роста. Может иметь полиповидную (т. е. аденома в европейском понимании), уплощённую или слегка углублённую форму. ВОЗ даёт двухуровневую систему систематизации неоплазии/дисплазии — лёгкая (low-grade) и тяжёлая (high-grade).
4. Внутрислизистая инвазивная неоплазия/карцинома - карцинома с погружением в собственную пластинку слизистой оболочки.
5. Инвазивная неоплазия/карцинома — карцинома с инвазией за пределы собственной пластинки слизистой оболочки [12].

В гистологии есть двух- и трехуровневая система классификации дисплазии. В первой выделяют low-grade и high-grade стадии, а во второй лёгкая, умеренная и тяжёлая. Причем high-grade стадия в двухуровневой системе включает в себя тяжелую форму и в большей степени умеренную дисплазию.

Дисплазия low-grade характеризуется минимальными нарушениями строения желёз, выстланных однорядным эпителием с базально вытянутыми ядрами, близко друг к другу расположенными. Местами ядра могут «подниматься» к апикальной поверхности клеток. Митоз таких клеток является довольно редким.

При дисплазия high-grade отмечаются более значимые нарушения — железы близко расположены, ветвящиеся. Также заметна псевдомногорядность эпителия, ядра округлой и овальной формы, с дисперсным более просветлённым хроматином, расположены на разных

уровнях клетки, в том числе многие в апикальной части, встречаются ядрышки, часты митозы.

1.3 Стадии рака желудка и лечение

После диагностирования рака желудка специалистам необходимо установить, на какой стадии находится болезнь. Стадия определяет характер терапии [15].

Онкологи выделяют 4 стадии рака. Первая стадия – ранний рак, состояние, при котором опухоль не выходит за пределы слизистой оболочки, ее размеры составляют несколько сантиметров. Выделяют несколько подгрупп:

- IA – небольшое новообразование, находящееся исключительно в пределах слизистой;

- IB – небольшое новообразование, но метастазированное в 1-2 лимфоузлах либо перешедшее на подлежащие слои слизистой оболочки без метастазирования в лимфоузлы [15].

Операбельное вмешательство на данной стадии позволяет практически 95% пациентов жить дальше, причем в большинстве случаев нет необходимости в послеоперационной профилактической химиотерапии [15].

Вторая стадия характеризуется увеличенным размером опухоли по сравнению с первой стадией, причем возможен выход за серозную оболочку, но без распространения на другие органы. Возможно прорастание метастаз в лимфатические узлы. Существует отрицательная корреляция между размером опухоли и степенью метастазирования [15]. Операбельный способ лечения благополучно переживает пятилетний период уже 75% пациентов. На данном этапе проводят резекцию в разных модификациях.

Третья стадия обнаруживается у каждого четвертого пациента, она характеризуется большими размерами опухоли и высокой степенью метастазирования. Количество пораженных лимфоузлов может достигать до 16. Выделяют три подтипа заболевания на данной стадии:

- А – опухоль прорастает за пределы серозной оболочки органа, но не затрагивает соседние органы, при этом возможно единичное или множественное поражение лимфатических узлов;

- В – новообразование распространяется на соседние структуры, происходит метастазирование в два лимфоузла. Здесь же возможен вариант, при котором опухоль остается в пределах органа, но тогда метастазы прорастают в три и более лимфоузлов;

- С – опухоль выходит за пределы органа, происходит метастазирование большого числа лимфоузлов [15].

Возможность операбельного вмешательства зависит от васкуляризации и иннервации раковой опухоли, а также степени ее прорастания в соседние органы и метастазирования в лимфатическую систему. В большинстве случаев применяют химиотерапию как до, так и после операции. Иногда хирургическое вмешательство оказывается невозможным из-за чересчур обширного распространения в брюшной полости. В таком случае прибегают к лучевой терапии сопряженной с циклами химиотерапии.

Последняя четвертая стадия характеризуется наличием метастазов в других органах, брюшине, размеры опухоли варьируются, количество пораженных лимфоузлов уже не учитывается. На данной стадии рак желудка диагностируется у 40% пациентов каждый год. В этом случае терапия направлена не на полное выздоровление больного, а на продление его жизни [15].

1.4 Роль цитокинов в онкогенезе

Цитокины — это довольно многочисленная и функционально универсальная группа гуморальных факторов системы иммунитета, в равной степени необходимая для реализации врожденного и адаптивного иммунитета. По природе это белковые или полипептидные факторы, лишенные специфичности в отношении антигенов. Продуцентами цитокинов являются преимущественно активированные клетки кроветворной и

иммунной систем. Данные факторы участвуют в межклеточном взаимодействии при кроветворении, воспалении, иммунных процессах и межсистемных коммуникациях [16].

По механизму действия цитокинов можно выделить следующие группы:

1. Провоспалительные (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , хемокины – IL-8) продуцируются и действуют на иммунокомпетентные клетки, инициируя воспалительный ответ. Высокий уровень этих цитокинов говорит об активности и тяжести патологического процесса.
2. Противовоспалительные (IL-4, IL-10, TGF- β и др.) – регулируют специфические иммунные реакции и ограничивают развитие воспаления.
3. Регуляторы клеточного и гуморального иммунитета (естественного или специфического), обладающие собственными эффекторными функциями (противовирусными, цитотоксическими) [26].

Цитокиновая система реагирует на изменения в организме. Так при раздражении слизистой оболочки желудка при воздействии патогенов происходит активирование ряда цитокиновых реакций, играющих важную роль в прогрессировании хронических воспалительных процессов в органе. Одним из главных цитокинов, включающихся в защитную реакцию организма является IL-2. Он является важным иммунорегуляторным цитокином, продуцируемым в основном активированными CD4⁺ Т-клетками, наивными CD8⁺ Т-клетками и дендритными клетками. Молекула цитокина состоит из 133 аминокислот с молекулярной массой 15,4 кДа. Рецептор для IL-2 имеет вид гетеротримера, состоящего из 3 субъединиц: IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ . Взаимодействие лиганда с рецептором активирует следующие сигнальные пути: сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (Ras/MAPK), сигнальный путь фосфоинозитид-3-киназы (PI3K/Akt) и JAK/Stat путь [34]. IL-2 может стимулировать пролиферацию и дифференцировку естественных киллерных клеток, а также стимулировать выработку естественных киллерных цитокинов, таких как ФНО-альфа, ИФН-

гамма. Индуцированная ИЛ-2 пролиферация происходит через пролиферативные сигналы через протоонкогены c-Fos и c-Myc в сочетании с антиапоптотическими сигналами через членов семейства Bcl-2. Кроме того, он также может усиливать индуцированную активацией гибель клеток в Т-лимфоцитах и устранять самореактивные клетки. Также была выявлена роль ИЛ-2 в В-клетках, в основном связанная с секрецией антител. В В-клетках, экспрессирующих IgM, ИЛ-2 и ИЛ-5 действуют синергически, повышая экспрессию генов тяжелой и легкой цепей, а также индуцируя de novo синтез гена цепи иммуноглобулина J. Последний необходим для олигомеризации пентамера IgM и представляет собой строго контролируемую стадию активации В-клеток. Таким образом, ИЛ-2 обладает широким спектром существенных биологических действий, и его дисфункция может оказывать негативное влияние на развитие рака [36].

Другим провоспалительным цитокином является ИЛ-8. Он активирует воспалительные клетки путем миграции нейтрофилов, мононуклеарных фагоцитов и тучных клеток и играет важную роль в приобретенных иммунных реакциях. С другой стороны, противовоспалительный цитокин ИЛ-10 является мощным фактором подавления воспаления. Баланс между ИЛ-8 и ИЛ-10 цитокинами может влиять на степень воспаления, что является потенциальным фактором развития гастрита и рака желудка [31]. Повышение уровня ИЛ-8 происходит в желудке, следовательно, ИЛ-8 выступает как значительный регуляторный аутокринный фактор в микроокружении опухоли, тесно связанный с раком желудка. ИЛ-8 способствует адгезии, миграции и инвазии раковых клеток. Избыточная экспрессия ИЛ-8 связана с инвазией и метастазированием опухоли. Поэтому ИЛ-8 рассматривается как важный многофункциональный фактор метастазирования рака желудка [32].

Интерферон-гамма (IFN- γ) является плеiotропным цитокином, эффекты которого можно описать следующим образом:

1. большой спектр противовирусного, противопаразитарного и противоопухолевого действия;
2. многочисленные иммуномодулирующие эффекты, в том числе стимуляция экспрессии АГ тканевой совместимости классов I и II;
3. необратимое цитотоксическое действие на трансформированные клетки, тогда как его цитостатическое влияние на нормальные клетки обратимо;
4. усиление цитотоксических реакций, опосредованных Т-лимфоцитами и НК-клетками;
5. одновременно селективно повышает резистентность нормальных клеток к цитопатическим эффектам НК-клеток [24].

Лейкоциты, инфильтрирующие опухоль, вырабатывают те же провоспалительные и проангиогенные факторы, замыкая этим порочный круг. IFN γ является основным активатором макрофагов, которые в свою очередь участвуют в стимулирующих воздействиях на опухоль. И сами раковые клетки способны продуцировать цитокины, а именно, IL-6 и IL-8, которые являются для них же факторами роста, увеличивая их митогенную активность [3].

TNF α , продуцируемый тучными клетками, описан Yipin Lv с коллегами в исследовании, где было установлено, что у пациентов с раком желудка отмечается высокая инфильтрация тучных клеток в опухолях, наблюдается повышенное содержание TNF α . В опытах *in vitro* регистрировалось подавление Т-клеточного иммунитета с помощью PD-L1, а *in vivo* опухолевые тучные клетки подавляли Т-клеточный иммунитет и рост опухолевых тканей. Однако данного эффекта не было при блокировании PD-L1 сигнального пути на тучных клетках [33].

IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF α - проангиогенные факторы, способствующие васкуляризации опухоли. Данный факт играет решающую роль в дальнейшем ее развитии, причем два последних цитокина являются к тому же хемоаттрактантами для лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль. Кроме того, TNF α , а также IL-1 β и IL-18 могут облегчать миграцию

иммунокомпетентных клеток к опухоли и способствовать инфильтрации, увеличивая экспрессию молекул клеточной адгезии на эндотелии сосудов [3].

В группе противовоспалительных цитокинов был рассмотрен IL-4. Он продуцируется Th2 и является фактором дифференцировки для T- и B-клеток. Наиболее сильный эффект IL-4 оказывает на регуляцию образования других цитокинов вследствие участия во многих биологических процессах (иммунный ответ, воспалительные реакции). IL-4 ограничивает синтез макрофагами провоспалительных IL-1 β , -6, -8, -12, TNF α , образование высокоактивных метаболитов кислорода, азота. А также IL-4 является кофактором пролиферации покоящихся B-лимфоцитов и индуцирует в этих клетках синтез IgE и IgG4. Известна способность IL-4 усиливать противоопухолевую активность макрофагов [24].

Аутеншлюс А. И. с коллегами установил, что между уровнем цитокинов и патогистологическими параметрами опухоли имеются как прямые, так и обратные достоверные корреляции. Прямые корреляционные связи отмечались между инфильтрацией опухоли макрофагами и содержанием TNF α и IL-8, между степенью васкуляризации и содержанием TNF α и IL-6. Такую корреляционную связь можно объяснить тем, что секретируемые этими клетками цитокины являются одновременно для них факторами хемотаксиса, которые привлекают к опухоли лейкоциты, секретирующие факторы роста сосудов и матриксные металлопротеиназы, что приводит к стимуляции ангиогенеза в опухоли. Корреляционные связи уровней TNF α и IL-6 со степенью васкуляризации можно объяснить плейотропным эффектом TNF α , IL-1 β и IL-6, за счет которого в одних условиях происходит стимуляция, а в других ингибирование ангиогенеза.

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Работа проводилась на базе НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН (директор – д.м.н., профессор Э.В. Каспаров) в лаборатории клинической патофизиологии (зав. лабораторией – д.м.н. О.В. Смирнова) в период с 2019 по 2021 годы. В исследование были включены только мужчины, средний возраст которых составил 39-51 год. Материалом исследования была венозная кровь, которая бралась у больного утром с 8 до 9 часов, натощак, из локтевой вены.

Была сформирована контрольная группа из мужчин, сопоставимых по возрасту с основной группой, без гастроэнтерологических жалоб и гастроэнтерологического анамнеза. В исследование не включались пациенты с ВИЧ-инфекцией, страдающие гепатитом, туберкулезом, язвенной болезнью желудка, другими онкологическими заболеваниями, имеющие сопутствующие острые и хронические заболевания в фазе обострения. Также в исследования не включались пациенты, отказавшиеся принять участия в научном исследовании. Количество человек в контрольной группе составило 85.

Вторая группа состояла из 50-ти пациентов с I-II стадией рака желудка. Набор происходил в КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского» в отделении онкоабдоминальной хирургии заведующий отделением Медведев Денис Александрович. Диагноз устанавливался врачами-онкологами. Критерии исключения пациентов из исследования аналогичны критериям контрольной группы.

Исследование проводилось с разрешения этического комитета НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН. В работе с обследованными пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые ст. 24 Конституции РФ и Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциацией [27].

Каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование, подтверждающее его добровольное участие в исследовании.

2.2 Иммуноферментный анализ

Концентрацию цитокинов (IL-2, IL-4, IL-8, TNF α , IFN λ) в сыворотке крови определяли иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Используемый твердофазный метод иммуноанализа основан на принципе «сэндвича». Анализ проводится в две стадии. На первой стадии используют калибровочные пробы с известной концентрацией IL-2, IL-4, IL-8, TNF α , IFN γ и исследуемые образцы. Пробы инкубируются в лунках стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами (МКАТ) к исследуемым цитокинам. Затем планшет отмывается. На второй стадии связавшиеся в лунках цитокины обрабатывают конъюгатом МКАТ к ним с пероксидазой (конъюгат МКАТ). Иммобилизованные в лунках планшета МКАТ специфичны к разным участкам молекулы IL- (2,4,8) TNF α , IFN γ . После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «иммобилизованные МКАТ – IL- (2,4,8), TNF- α , IFN γ - конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (ортофенилендиамина). Интенсивность окраски хромогена пропорциональна концентрации IL- (2,4,8), TNF- α , IFN γ в анализируемом образце. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом результаты учитываются фотометрически. Концентрацию исследуемых цитокинов в пробах определяют по калибровочному графику.

2.3 Статистическая обработка данных

По результатам исследования на персональном компьютере в пакете электронных таблиц MS Excel 2010 была сформирована база данных. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel, 2007 (Microsoft, США). Обработка полученных данных

включала подсчет непараметрических данных: медиану (Me) и персентили (C25-C75). Статистическую значимость различий определяли с использованием рангового критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверки статистических гипотез принимался равным $p < 0,05$. Был проведен корреляционный анализ взаимосвязей содержания цитокинов и степени рака желудка.

3 Результаты исследования

По полученным данным была сформирована таблица (табл. 1). При раке желудка на ранних стадиях было выявлено развитие по Th1- и Th2-опосредованному иммунному ответу.

Таблица 1 Содержание цитокинов у больных раком желудка на ранних стадиях и у контрольной группы

Показатели	Контрольная группа 85 человек		РЖ I-II 50 человек	
	Me	C25-C75	Me	C25-C75
IL-2	1,1	0,5 - 3,05	5,2	3,8 – 8,7
			p<0,001	
IL-4	7,0	5,6 – 7,8	93,3	68,6 – 122,1
			p<0,001	
IL-8	2,1	0,5 – 4,0	41,1	12,2 – 99,5
			p<0,001	
TNF α	0,54	0,38 – 0,87	0,76	0,45 – 0,95
			p<0,001	
IFN- γ	0,6	0,22 – 4,0	4,4	3,3 – 6,9
			p<0,001	

В ходе исследования было установлено содержание про- и противовоспалительных цитокинов у больных раком желудка и условно здоровых людей. IL-2 из группы провоспалительных цитокинов продуцируется Т-клетками в результате антигенной и миогенной стимуляции. Цитокин действует через свой рецептор, который состоит из 3 субъединиц: CD25, CD122, CD32. IL-2 отвечает за развитие воспалительных реакций, пролиферацию Т-клеток и необходим для протекания процессов, регулирующих иммунный ответ. Медианное значение IL-2 у больных раком желудка составило 5,2 пг/мл. Это в 4,73 раза больше, чем показатель людей контрольной группы, который составил 1,1 пк/мл.

Рис. 1 Содержание IL-2 в контрольной и исследуемой группах

Далее был рассмотрен IL-8. Он относится к семейству хемокинов. Молекула имеет специфическую трехмерную структуру, обусловленную наличием 4 цистеинов. Подобная конфигурация необходима для взаимодействия со специфическими рецепторами. IL-8 – хемокин для нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов и макрофагов. Высвобождение цитокина индуцирует миграцию этих клеток к участку тканевого повреждения. При исследовании было установлено, что в исследуемой группе данный показатель в 19,57 раз больше, чем в контрольной. Там уровень IL-8 составил 2,1 пк/мл. У пациентов с раком желудка I-II стадии 41,1 пк/мл.

Рис. 2 Содержание IL-8 в контрольной и исследуемой группах

В группе провоспалительных цитокинов был также изучен фактор некроза опухоли альфа - TNF α . Он синтезируется как мембранный белок моноцитами и макрофагами. Активной формой является гомотример, образующий бета-складчатую структуру. Такая конфигурация позволяет молекуле цитокина связываться с рецептором, в результате чего образуется более устойчивый комплекс. TNF α стимулирует продукцию IL-8, IFN- γ . Помимо этого активирует лейкоциты. В результате исследования было отмечено, что в группе пациентов с раком желудка медианное значение TNF α в 1,4 раза выше, чем в контрольной. Значения составили 0,76 и 0,54 пг/мл соответственно.

Рис. 3 Содержание TNF α в контрольной и исследуемой группах

Последним в группе провоспалительных цитокинов было оценено содержание IFN- γ . Это один из важных активаторов макрофагов и индуктор экспрессии МНС. Цитокин продуцируется естественными киллерами, Т-

киллерами и нецитотоксическими врожденными лимфоидными клетками. IFN- γ обладает иммуностимулирующим и иммуномодулирующим действиями. Также он способен ингибировать репликацию вируса. Этими свойствами обусловлена важность IFN- γ в иммунной системе. В ходе исследования было установлено, что в исследуемой группе содержание IFN- γ составило 4,4 пг/мл, а в контрольной – 0,6 пк/мл. Эти показатели говорят о том, что уровень IFN- γ у пациентов с раком желудка в 7,3 раза больше, чем у условно здоровых людей.

Рис. 4 Содержание IFN- γ в контрольной и исследуемой группах

В группе противовоспалительных цитокинов был рассмотрен IL-4. Синтезируется этот интерлейкин тучными клетками, Th-клетками и базофилами. IL-4 участвует в усилении пролиферации T- и B-лимфоцитов и дифференцировки B-клеток в клетки памяти. Также он индуцирует превращение наивных T-хелперов в Th2-клетки. Данные свойства обуславливают ключевую роль IL-4 в качестве регулятора адаптивного и гуморального иммунитета. Содержание цитокина в исследуемой группе оказалось в 13,33 раза выше, чем в контрольной. Медианные значения составили 93,3 пк/мл и 7 пк/мл соответственно.

Рис. 5 Содержание IL-4 в контрольной и исследуемой группах

Заключение

В ходе исследования было оценено содержание противо- и провоспалительных цитокинов в группе больных раком желудка на I-II стадиях относительно контрольной группы. Было установлено статистически достоверное повышение уровня цитокинов обеих групп. Отмечается наибольшее увеличение концентрации IL-8 в исследуемой группе - 2,1 пк/мл, что в 19,57 раз больше относительно контрольной группы. Также значительное различие между двумя группами показал IFN- γ . Его уровень составил в контрольной группе 0,6 пк/мл. Это в 7,3 раза меньше, чем в группе пациентов с раком желудка. Меньшее различие показали IL-2 и TNF α . Медианное значение IL-2 составило 5,2 пг/мл, что указывает на повышение концентрации по сравнению с контрольной группой в 4,73 раза. Содержание TNF α в группе больных людей составило 0,76 пг/мл, а в контрольной 0,54 пг/мл. Полученные медианные значения показывают, что концентрация TNF α 1,4 раза больше в группе больных раком желудка. В группе провоспалительных цитокинов также была отмечена статистически значимая разница между контрольной и исследуемой группами. Содержание IL-4 в 13,33 раза увеличено по отношению к контрольной группе.

Подобные данные позволяют говорить о положительной корреляции в обеих исследуемых группах цитокинов. [...]

Исходя из полученных данных можно заключить, что при раке желудка выявляются реакции, протекающие как по Th1-, так и по Th2-типу. Th1 реакция отвечает за клеточный иммунитет, а Th2 реакция – за гуморальный иммунитет. По соотношению Th2/Th1 можно оценить функциональное состояние лейкоцитарного звена иммунитета. Поскольку Th1 иммунные клетки продуцируют IFN γ , IL-2, TNF α , IL-8, а Th2 клетки, в свою очередь, продуцируют IL-4, можно говорить о том, что в данном случае Th2/Th1 является плохим прогностическим показателем.

Список использованных источников

1. World Cancer Research Fund American Institute for Cancer Research [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/stomach-cancer-statistics>
2. Российский онкологический портал [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.oncoforum.ru/o-rake/statistika-raka/statistika-raka-zheludka.html>
3. Аутеншлюс А.И. Цитокины и патологическая картина злокачественных новообразований при раке желудочно-кишечного тракта / А.И. Аутеншлюс, А.В.Соснина, Е.С.Михайлова и др. // Медицинская иммунология – 2009. - №1 – С.29-34
4. Сороговец А.И. Морфологический спектр желудочной биопсии у пациентов призывного возраста / А.И.Сороговец, А.Д. Зубарева / Проблемы и перспективы развития современной медицины // 2017 – С.238-239

5. Prashanth R. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention / PrashanthRawla, Adam Barsouk // Gastroenterology – 2019 - №14 (1) – С. 26-38
6. Симбирцев А.С. Цитокины в лабораторной практике / А.С.Симбирцев, А.А.Тотолян // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение – 2015 - №2 – С.82-98
7. SkenderTopi Gastric Cancer in History: A Perspective Interdisciplinary Study / SkenderTopi, Luigi Santacroce, LucreziaBottalico, Andrea Ballini, Alessio Danilo Inchingolo, Gianna Dipalma, Ioannis Alexandros Charitos, and Francesco Inchingolo //Cancers. – 2020
8. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М.Егоров, А.П.Осипов, Б.Б.Дзантиев, Е.М.Гаврилова. – Москва: Издательство «Высшая школа», 1991. – С. 3-42
9. Виртуальный медицинский справочник [Электронный ресурс] – Режим доступа:<https://www.smed.ru/guides/43593>
- 10.Sadjadi A. Neglected role of hookah and opium in gastric carcinogenesis: a cohort study on risk factors and attributable fractions / A. Sadjadi, Derakhshan,A. Yazdanbod et al.// Internet Journal Cancer – 2014. - №134 – С.181-188
11. Moore A. The burden of stomachcancer in indigenous populations: a systematic review andglobal assessment / A. Moore, S. Hassler et al. // Gut – 2014. – №63 (1) – С.64-71
- 12.Михалева Л.М. Предраковые поражения и ранний рак желудка: современные клинико-морфологические данные / Л.М.Михалева, А.Е.Бирюков, Н.И.Поляно // Клиническая медицина – 2017. - №95 (10) – С.881-887
- 13.Костюкевич О.И. Атрофический гастрит: что мы понимаем под этим состоянием. Современные подходы к диагностике и лечению / О.И. Костюкевич // Российский медицинский журнал – 2010. - №28

- 14.Мозговой С.И. Кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка: от природы феномена к прогнозу / С.И.Мозговой // Актуальные проблемы гастроэнтерологии – 2009. - №3
15. Официальный сайт клиники «Медицина 27/7» города Москвы [Электронный ресурс] – Режим доступа:<https://medica24.ru.turbopages.org/s/medica24.ru/zdorovyj-obraz-zhizni/meditsinskij-spravochnik/stadii-raka-zheludka>
16. Иммунология / А.А.Ярилин. – Москва, 2010. – С.190-226
- 17.Васильев Ю.В. Дисплазия желудочно-кишечного тракта / Ю.В. Васильев // Международный медицинский журнал – 2013. - №2 – С.58-60
- 18.Портал с медицинской информацией [Электронный ресурс] – Режим доступа:https://medfiles.at.ua/publ/onkologija/klinicheskie_lekcii/rak_zheludka_klinika_diagnostics_i_lechenie/22-1-0-66
- 19.Студенческая онлайн-энциклопедия [Электронный ресурс] – Режим доступа:https://studopedia.ru/2_95439_lektsiya-.html
- 20.Васильева, Г. И. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилокинами / Г. И. Васильева, И. А. Иванова, С. Ю. Тюкавкина // Иммунология. – 2000. – № 5 – С. 11 -17
- 21.Jung, M. Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy / M. Jung, R. Sabat et al. // Immunology – 2004. -№34 – С.481-493
- 22.Руководство по инфекционному контролю в стационаре. Пер. с англ. Под ред. Р. Венцеля, Т. Бревера , Ж.-П Бутцлера. Смоленск: МАКМАХ – 2003. – С. 232-238
- 23.Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition/American Cancer Society [Электронныйресурс] – Режимдоступа: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/global.html>


24. Araujo-Filho I., Prevalence of helicobacter pylori infection in advanced gastric carcinoma / Araujo-Filho I., Brando-Neto J. / / Arq. Gastroenterol – 2006. - №43 – С.288-292.
25. Бирюков А.Е. Клинико-морфологические и молекулярно-генетические особенности дисплазии и раннего рака желудка: диссертация кандидата медицинских наук: 14.03.02 / Бирюков Андрей Евгеньевич. – Москва, 2018
26. Сайт Пропионикс [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://propionix.ru/citokiny>
27. Студенческий сайт учебных материалов [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://studfile.net/preview/5723150/page:38/>
28. Сайт медицинской информации [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.polimed.com/articles-immunofermentnyjj-analiz-ifa-elisa-sut-princip-metoda-i-ehtapy-issledovanija.html>
29. Студенческая онлайн-библиотека [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://studbooks.net/912482/meditsina/materialy_metody
30. Иммунохимический анализ в лабораторной медицине / В. В. Долгов. — М.-Тверь: ООО "Издательство "Триада"", 2015. — С. 34—38
31. Sushil Kumar, Niraj Kumari, Rama Devi Mittal, Samir Mohindra, Uday C. Ghoshal Association between pro-[IL-8] and anti-inflammatory [IL-10] cytokine variants and their serum levels and H. pylori-related gastric carcinogenesis in northern India. *Meta Gene*. 2015: 10
32. Jun Shi, Yong-Jin Li, Bing Yan and Pin-Kang Wei Interleukin-8: A potent promoter of human lymphatic endothelial cell growth in gastric cancer. *ONCOLOGY REPORTS*. 2015; 33: 2703-2710
33. Yipin Lv, Yongliang Zhao, Xianhua Wang, Na Chen, Fangyuan Mao, Yongsheng Teng, Tingting Wang, Liusheng Peng, Jinyu Zhang, Ping Cheng, Yugang Liu, Hui Kong, Weisan Chen, Chuanjie Hao, Bin Han, Qiang Ma, Quanming Zou, Jun Chen and Yuan Zhuang Increased in intratumoral mast

- cells foster immune suppression and gastric cancer progression through TNF- α -PD-L1 pathway. *Journal of Immunotherapy of Cancer*. 2019: 7-54
34. P. A. Levashov, S. A. Sedov, N. G. Belogurova, S. V. Shipovskov, A. V. Levashov. Bacteriolytic activity of human interleukin-2
a. — 2012. — Т. 77, вып. 11. — С. 1312—1314.
35. Лапина Т.Л., Тертычный А.С., Пирогов С.С. и др. Дисплазия эпителия слизистой оболочки желудка у больных хроническим *H. pylori*-ассоциированным гастритом: все ли так однозначно? // *РЖГГК*. 2015. № 3. С. 90–101.
36. Zhao, H., & Wang, R. IL-2-330T/G polymorphism and cancer risk: A meta-analysis // *OncoTargets and Therapy*. – 2015. – Т. 8. – С. 1753-1760.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е.И. Шишацкая

«25» июня 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Изучение содержания провоспалительных и противовоспалительных
цитокинов при раке желудка

Руководитель



профессор, д.м.н.

О.В. Смирнова

Выпускник



Н.А. Регнер

Красноярск 2021