

ДИНАМИКА УРОВНЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ ПОЛИМОДАЛЬНЫХ ЛОКАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА ЯИЧНИКОВ

© 2013 И.И. Антонеева, Т.П. Генинг, Т.В. Абакумова, С.О. Генинг

Ульяновский государственный университет

Поступила в редакцию 21.03.2013

Оценивается уровень противовоспалительных цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) в сыворотке крови при прогрессировании рака яичников у первичных больных раком яичников на I-IV клинической стадии заболевания (по FIGO) и доноров, кроме уровня TNF-, IFN- и IL-1 в сыворотке крови. В ткани первичной опухоли проводили квантитрию составляющих, а также оценивали уровень экспрессии p53 и bcl-2. Установлено, что в процессе прогрессирования рака яичников неоплазма может интегрироваться в основные гомеостатические процессы макроорганизма благодаря использованию региональных и системных функций цитокинов, в том числе и секретируемых опухолью - TNF-, IFN- и IL-1. Наиболее значимыми для усиления биологического потенциала опухоли являются такие их эффекты, как стимулирование пролиферации опухолевых клеток и образование сосудов в зоне опухолевого роста.

Ключевые слова: рак яичников, цитокины, p53, bcl-2, Ki-67, PCNA

ВВЕДЕНИЕ

При злокачественном росте с цитокинами взаимодействует две системы: неоплазма – цитокины и иммунная система – цитокины [3]. При этом опухолевые клетки могут как экспрессировать соответствующие рецепторы, так и продуцировать цитокины. IL-1 является медиатором как местного так и дистантного действия на разные ткани и обладает широким спектром биологической активности. В опухолевом процессе большую роль играет IL-1 β . Фактор некроза опухоли (TNF- α) получил название по основному биологическому эффекту-лизису опухолевых клеток. Точка зрения о безусловном противоопухолевом влиянии TNF- α с середины 90-х годов была опровергнута убедительными дока-

зательствами участия этого цитокина в канцерогенезе и опухолевой прогрессии. Продуцировать TNF- α способны многие опухолевые клетки, в том числе и клетки рака яичников (РЯ). При росте опухоли уровень содержания TNF- α в крови может повышаться как за счет его продукции опухолевыми клетками, так и в результате усиленного выделения макрофагами [8]. Интерфероны (IFN) представляют одну из самых быстро реагирующих систем иммунологической защиты. Точный механизм их противоопухолевого действия не известен. Предполагается прямое и непрямое противоопухолевое действие IFN [9].

Цель исследования – изучить динамику изменений уровня цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) и их роль в развитии полимодальных локальных и дистантных эффектов при прогрессирующих формах рака яичников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследуемая группа состояла из 83 первичных больных РЯ, находящихся на I-IV клинической стадии заболевания (по FIGO). Контрольную группу составили 40 женщин-доноров. Концентрацию TNF- α , IFN- γ и IL-1 β в сыворотке крови измеряли методом ИФА. Срезы, полученные из блоков биопсийного материала, окрашивались гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Малори, альциановым синим. Квантитрию составляющих опухоли осуществляли в 10 произвольных полях зрения на микроскопе "ReichztPolivar 2" с планообъективом FJAP0 10x0,30, совмещенным с цифровой видео-

Антонеева Инна Ивановна, доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики.

E-mail: aii72@mail.ru

Генинг Татьяна Петровна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии медицинского факультета, начальник лаборатории молекулярной и клеточной биологии Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы. E-mail: Naum-53@yandex.ru

Абакумова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и патофизиологии, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы. E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Генинг Снежанна Олеговна, студент 5 курса медицинского факультета, стажер-исследователь Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы. E-mail: sgening@bk.ru

камерой JVC разрешением 800x600 пикселей. При оценке экспрессии mtp53, bcl-2, Ki-67 и PCNA использовали моноклональные антитела фирм Novocastra и Dako. Статистическую обработку данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни и коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено существенное и достоверное повышение уровня IL-1 β , IFN- γ и TNF- α у больных РЯ по сравнению со здоровыми (табл. 1).

Из данных табл.1 следует, что уровни IL-1 β , TNF- α и IFN- γ статистически значимо повышены по сравнению с контролем уже на I-ой клинической стадии заболевания и продолжали повышаться на II-IV стадии заболевания. Наблюдаемые изменения уровня TNF- α и IFN- γ обнаруживали прямую положительную корреляцию со стадией заболевания ($r=0,700$ и $r=0,120$ соответственно).

Источником данных провоспалительных цитокинов, видимо, могут быть как сами опухолевые клетки, так и клетки-эфффекторы, круг которых расширяется по мере прогрессирования опухоли, так как организм все в большей степени использует воспалительный тип ответа на новообразование [5]. Кроме того, прирост концентрации, в частности TNF- α , может обеспечиваться, по мнению ряда авторов [2], двумя аддитивными механизмами: селекцией клеток, резистентных к цитотоксическому действию TNF- α и тем, что экспрессируемые опухолевыми клетками антигены также индуцируют повышенную продукцию TNF- α . При этом ограничение чувствительности рецепторов опухолевых клеток к регуляторным молекулам также предопределяет прирост концентрации цитокинов и их выраженное побочное влияние на рецепторы нормальных клеток.

Провоспалительные цитокины, и в частности, IL-1 и TNF- α , обладают системным действием. Так, IL-1, способен проникать через гематоэнцефалический барьер и стимулировать в паравентрикулярном ядре гипоталамуса секрецию

кортикотропинвысвобождающего фактора, который повышает в аденогипофизе выработку АКТГ. Последний инициирует в коре надпочечников выброс глюкокортикоидов [1]. Это ведет к усилению действия факторов стресса на все системы. TNF- α также инициирует активность эндокринных желез, что приводит к увеличению уровня АКТГ, гонадотропина и других гуморальных факторов. Результатом системного действия на организм TNF- α и IL-1 является развитие продромального синдрома, проявляющегося снижением аппетита, сонливостью, лихорадкой, повышением болевой чувствительности.

Иммунная толерантность малигнизированных клеток появляется на мембранном, цитоплазматическом и генетическом уровнях. Клеточная мембрана, цитоплазма и ядро опухолевой клетки защищают ее от эфффекторов иммунной системы. При этом к возможностям самой раковой клетки добавляются защитные механизмы микроокружения. Например, инфильтрацию неоплазмы клетками иммунной системы и активность эфффекторных молекул ограничивают фибриновый и слизистый барьеры. Непосредственные контакты раковых и стромальных клеток могут приводить и к активной пролиферации фибробластов в пограничной зоне, что особенно заметно в некоторых образцах серозных и муцинозных опухолей яичников (рис. 1).

В этих условиях соединительнотканнные клетки, ориентируясь длинной осью параллельно линии паренхима – строма, выстраивают плотный пограничный вал. При этом фибробласты тесно прилегают к друг другу и одновременно контактируют с раковыми клетками на пограничной линии. Здесь чаще встречаются молодые и средние формы фибробластов, реже обнаруживаются большие типы фибробластов и фиброциты (рис. 2). Фибриновые волокна всегда присутствуют в опухолевой ткани и это особенно характерно для зоны активной пролиферации неоплазмы. Мощный фибриновый барьер образуется в результате стимуляции фибриногенеза отсутствующего фибринолиза. Опухолевые клетки при этом активируют компоненты свертывающей системы и образование фибрина че-

Таблица 1. Уровень цитокинов у больных РЯ на различных клинических стадиях заболевания

Группы Показатели	контроль	I стадия	II стадия	III стадия	IV стадия
	N=48	N=12	N=12	N=40	N=40
IL-1 β	36,8 \pm 10,74	216,7 \pm 49,35*	236,7 \pm 24,99*	248,5 \pm 9,00*	230,9 \pm 15,04*
TNF- α	31,0 \pm 2,82	55,0 \pm 9,53*	64,4 \pm 13,38*	104,8 \pm 9,90*	93,8 \pm 9,96*
IFN- γ	44,0 \pm 7,67	95,8 \pm 9,49*	107,1 \pm 8,76*	120,9 \pm 10,33*	114,4 \pm 15,17*

Примечание: данные статистически значимо отличаются от аналогичных:

*- в контроле; ‘- от соответствующих показателей на предыдущей клинической стадии заболевания.

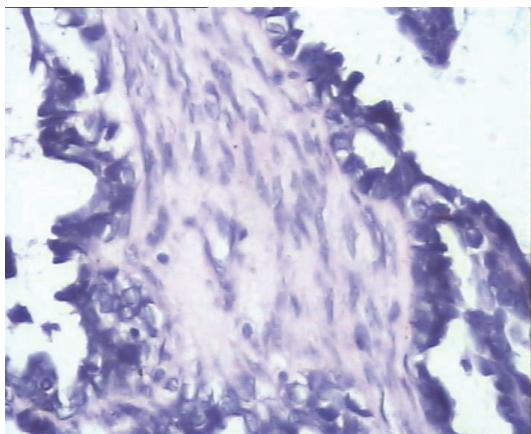


Рис. 1. Фибробласты стромы серозного РЯ, располагающиеся вблизи зоны инвазии раковых клеток в строму (окраска гематоксилин-эозином, микрофото. X600)

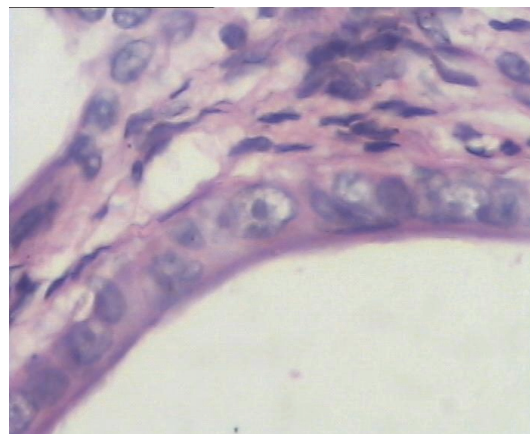


Рис. 2. Фиброциты дегенерирующие, РЯ (окраска гематоксилин-эозином, микрофото. X1200)

рез присутствующие в зоне опухоли макрофаги. Последние, под влиянием неоплазмы, усиливают продукцию провоспалительных цитокинов IL-1, TNF- α , которые индуцируют на эндотелии и активированных макрофагах экспрессию тканевого фактора свертывания крови. Неоплазма использует фибриновую сетку в качестве преграды для клеток иммунной системы. Кроме того, фибрин повышает устойчивость малигнизированных клеток к химиотерапии. Фибрин также необходим для роста малигнизированных клеток. Его нити формируют тракт для перемещения этих клеток в структуре ткани и защищают их от цитотоксических эффекторов иммунной системы. Кроме того, раковые клетки потребляют фибрин, используя его в качестве основного трофического материала [6]. Нити фибрина стимулируют фибробласты, которые поддерживают в опухоли концентрацию ростовых факторов и секретируют компоненты стромы опухолевой ткани. Кроме того, в структуре опухоли фибрин выполняет функцию внеклеточного матрикса. Неоплазма использует фибрин, благодаря своей способности контролировать систему плазмин-тканевые ингибиторы-активаторы плазминогена. Процесс образования ингибитора активатора плазминогена в зоне малигнизации при этом инициируется провоспалительными цитокинами [7].

Для усиления биологического потенциала неоплазмы и поддержания ее роста и развития одним из наиболее значимых представляются такие эффекты IL-1 и TNF- α , как образование *de novo* сосудов в зоне опухолевого роста, расширение и нарушение проницаемости этих сосудов, стимуляция пролиферации и блокирование апоптоза опухолевых клеток. При изучении параметров сосудистого русла первичной опухоли при раке яичников на различных клинических стадиях заболевания нами было установлено, что в процессе опухолевой прогрессии имеется тенденция к возрастанию объема и плотности сосудов на 1 мм² опухоли (табл. 2).

Как следует из рис. 3 (А, Б) это соответствует возрастанию содержания в крови провоспалительных цитокинов IL-1 и TNF- α . Следует, однако, отметить, что данный процесс происходит на фоне возрастающих концентраций IFN- γ , который ингибирует ангиогенез в опухоли. Возможно, именно этот фактор определяет то, что возрастание объема и плотности сосудов в опухоли не были статистически значимы.

Также было показано, что основную массу сосудов микроциркуляторного русла первичных раковых опухолей яичников составляют капилляры с диаметром более 10 мкм и с дефектами эндотелиальной выстилки (рис. 4).

Таблица 2. Параметры сосудистого русла первичной опухоли при раке яичников на различных клинических стадиях заболевания

Показатели / Стадия РЯ	Объем сосудов, %					Сосуды на 1 мм ² опухоли				
	М	m	к.в.	Макс.	Мин.	М	m	к.в.	Макс.	Мин.
I-II, n=33	3,81	0,88	0,48	10,7	1,2	20,4	4,71	0,35	59,1	10,2
III, n=40	4,06	0,45	0,51	11,4	1,6	22,71	2,17	0,34	61,3	11,8
IV, n=33	4,66	0,48	0,46	12,8	2,9	24,43	2,74	0,38	63,2	13,1

Примечание: различие показателей по стадиям статистически не значимо (p>0,05)

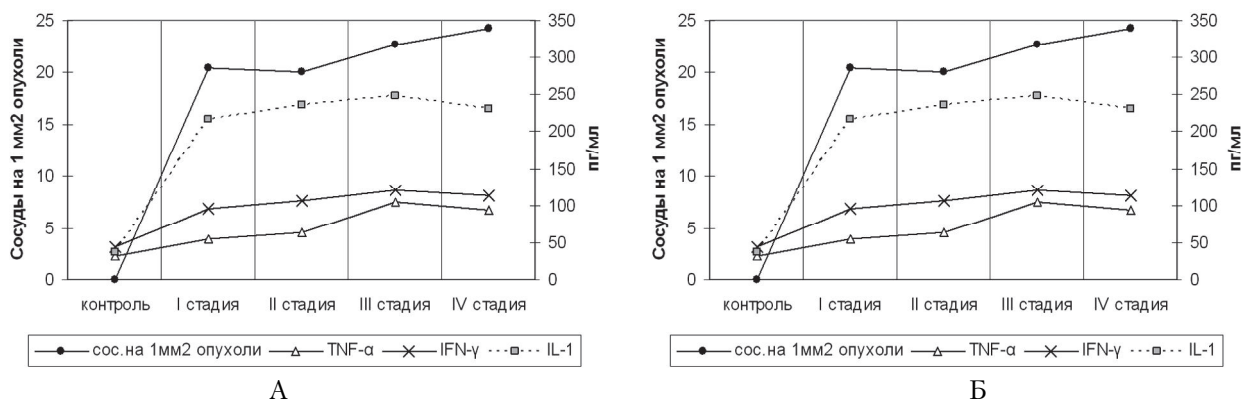


Рис. 3. (А, Б). Изменение параметров сосудистого русла первичной опухоли и содержания провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF- α и IFN- γ) в крови при РЯ на различных клинических стадиях заболевания

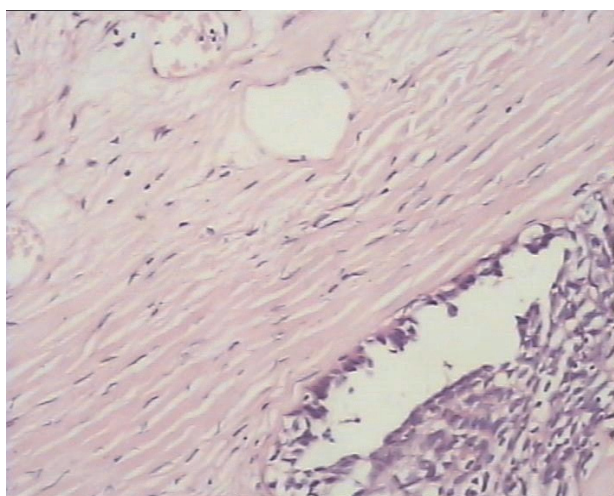


Рис. 4. Синусный сосуд с дефектом эндотелиальной выстилки (окраска гематоксилин-эозином, микрофото. X600)

Селективное давление со стороны нормоцитов, продуцирующих провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1) может привести к образованию дефектных антионкогенов и их неактивных РНК-продуктов. К их числу относится белок p-53 – один

из индукторов апоптоза и ген Bcl-2, продукт которого обладает цитопротекторной активностью [4].

По поводу судьбы p53 – ключевого внутриклеточного белка – супрессора злокачественной трансформации клетки – на сегодня существует несколько точек зрения. Согласно мнения одних авторов, при злокачественной трансформации низкий уровень p53 связан с ускоренной деградацией этого белка. В результате ограничиваются возможности реализации апоптотических сигналов по p53-зависимому пути. Согласно другой точки зрения [10], в малигнизированных клетках имеют место мутации гена p53, связанные с усиленной экспрессией мРНК отдельных цитокинов. С другой стороны, наличие мутантной формы гена p53 рассматривают как фон, необходимый для развития дисрегуляции цитокинов связь между экспрессией мутантного гена p53 и цитокинами прослеживается при исследовании РЯ. Так, в результате проведенных нами исследований установлено (рис. 5) возрастание процентного содержания атипических эпителиальных клеток яичника, экспрессирующих p53, в динамике раковой прогрессии. Увеличение p53⁺ клеток яичника коррелировало с экспрессией IL-1 β и TNF-

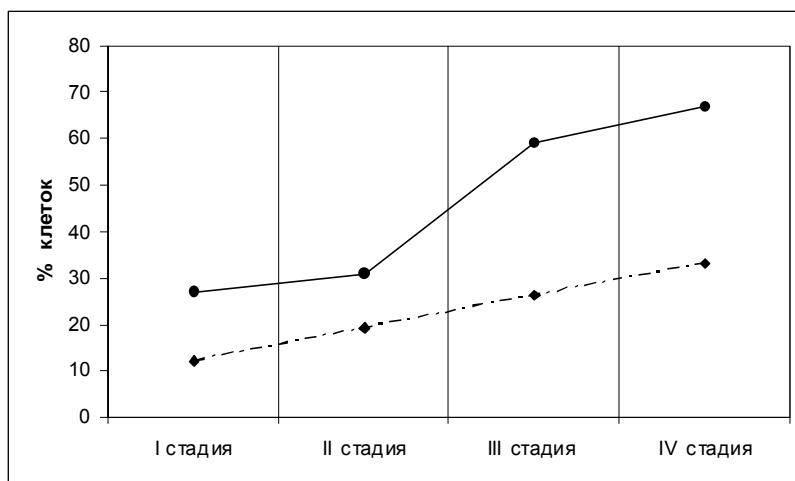


Рис. 5. Динамика процентного содержания атипических эпителиальных клеток яичника, экспрессирующих p53 (-) и Bcl-2 (- · -) на различных клинических стадиях заболевания

α . Корреляционные связи на различных стадиях заболевания: средняя ($r=-0,6618$) и сильная ($r=0,8407$) соответственно.

Проапоптотическая активность цитокинов, в частности IFN- γ , может быть преодолена в условиях избытка белка c-myc, уровень которого низок в нормальных клетках и высок в опухолевых. Развитие апоптоза при действии цитокинов на опухолевые клетки требует мобилизации проапоптотических факторов митохондрий. Устойчивая компарментализация этих факторов обеспечивается белками семейства Bcl-2, часть из которых индуцируют апоптоз, другая – обладает антиапоптотической активностью. При этом в выживающих малигнизированных клетках экспрессируются антиапоптотические белки этого семейства, но ограничена экспрессия проапоптотических форм [11]. Белки семейства Bcl-2 необ-

ходимы для блокирования митохондриальных пор для проапоптотических факторов.

Результаты наших исследований свидетельствуют об увеличении клеток РЯ, экспрессирующих Bcl-2, при прогрессировании опухоли (корреляция со стадией заболевания положительная высокая, $r=0,6255$).

К наиболее значимым для усиления потенциала опухоли и поддержания ее роста и развития эффектам цитокинов с системными эффектами (TNF- α и IL-1) относится их способность стимулировать пролиферацию опухолевых клеток. Нами установлено увеличение пролиферативной активности и митотического индекса в неоплазме при прогрессировании РЯ (рис. 6).

Значимая корреляция показателей PCNA, Ki-67 и митотического индекса с уровнем провоспалительных цитокинов представлена в табл. 3.

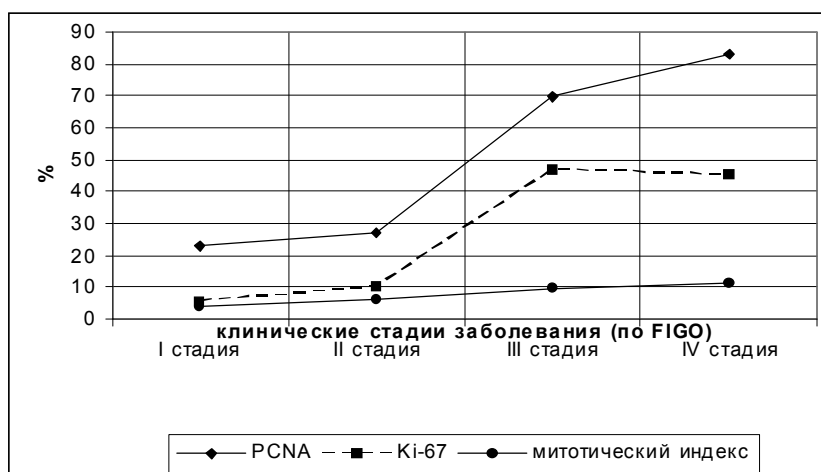


Рис. 6. Пролиферативная активность и митотический индекс раковых клеток первичного опухолевого узла при прогрессировании РЯ

Таблица 3. Корреляционные связи уровня провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IFN- γ и TNF- α) с показателями пролиферативной активности, апоптоза и параметрами микроциркуляторного русла при прогрессировании РЯ

Показатель	I стадия РЯ			II стадия РЯ			III стадия РЯ			IV стадия РЯ		
	IL-1 β	TNF- α	IFN- γ	IL-1 β	TNF- α	IFN- γ	IL-1 β	TNF- α	IFN- γ	IL-1 β	TNF- α	IFN- γ
Ki-67	-	-0,95	-	0,40	-0,44	-	-	-	-	0,39	-	-
PCNA	0,80	-0,40	0,60	-0,43	-	-	-	-	-	-	-0,35	-
Митотич. индекс	1,00	-0,80	0,80	0,46	-0,92	-0,43	-	-	-	0,44	-	-
Об.сосудов, %	0,05	-0,24	-0,60	0,05	-0,24	-0,60	0,14	0,21	0,14	0,06	-0,08	0,07
Сосуды на 1мм ² опухоли	-	-	-0,32	-	-	-0,32	-	-	-	-	-	-
p53	-	-	-	-0,67	-	-	-	-0,40	-	-	-	-
Bcl-2	-	-0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таким образом, в процессе прогрессирования неоплазма интегрируется в основные гомеостатические процессы макроорганизма благодаря использованию региональных и системных функций цитокинов. При этом из всего спектра цитокинов, в том числе и секретируемых опухолью, ключевая роль принадлежит цитокинам с системными эффектами – IL-1, TNF- α и IFN- γ .

Наиболее значимыми для усиления биологического потенциала опухоли являются такие эффекты этих цитокинов, как стимулирование пролиферации опухолевых клеток, образование сосудов в зоне опухолевого роста.

Работа поддержана грантом ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009-2013гг. и Гбс. заданием Министерства образования и науки Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акмаев И.Г., Гриневиц В.В. От нейроэндокринологии до нейроиммуноэндокринологии // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2001. Т.131. №1. С.22-33.
2. Антонов В.Г., Козлов В.К. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы. Внеклеточные и клеточные механизмы общей иммунбодепрессии и иммунной резистентности // Цитокины и воспаление. 2004. №1. С.8-19.
3. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Система интерлейкинов и рак (новые аспекты взаимодействия опухоли и организма). Киев: ДИА, 2000. 224 с.
4. Красильников М.А. Сигнальные пути, фосфатидилинозит-3-киназой, и их значение для роста, выживаемости и злокачественной трансформации клеток // Биохимия. 2000. Т.65. Вып.1. С. 68-78.
5. Лукина Е.А. Система мононуклеарных фагоцитов и биологические эффекты противовоспалительных цитокинов // Росс. журнал гастр., гепат. и колопрокт. 1998. №5. С.7-13.
6. Михайлов В.В. Малигнизация клеток. Опухолевая болезнь // Основы патологической физиологии: Руководство для врачей. М.: Медицина, 2001. С.264-281.
7. Система активаторов плазминогена в ремоделировании сосудов и ангиогенеза / Е.В. Парфенова, О.С. Плеханова, В.А. Ткачук // Биохимия. 2002. Т.67. Вып.1. С. 139-156.
8. Рыдловская А.В., Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм гена TNF- α и патология // Цитокины и воспаление. 2005. №3. С.2 8-32.
9. Система интерферон – естественные клетки-киллеры у больных с опухолями яичников / А.М. Сорокин, Н.Б. Моисеева, А.Н. Чередеев и др. // Акушерство и гинекология. 1988. №5. С. 23-27.
10. Expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), interleukin-6, (IL-6), interleukin-1 beta (IL-1 beta), interleukin-11 (IL-11) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in p53-characterised human ovarian carcinomas / J.G. Asschert, E. Vellenga, Hollema H. et al // Eur. J. Cancer. 1997. Vol. 33(13). P. 2246-51.
11. Kelekar T., Thomson C. Bcl-2-family proteins // Trends Cell Biol. 1998. Vol. 8. №3. P. 324-330.

DYNAMICS OF THE ANTI-INFLAMMATORY CITOKINES AND THEIR ROLE IN THE MULTIMODAL LOCAL EFFECT ON THE PROGRESSION OF OVARIAN CANCER

© 2013 I.I. Antoneeva, T.P. Gening, T.V. Abakumova, S.O. Gening

Ulyanovsk State University

Dynamics of change of level cytokine by TNF-, IFN-, IL-1 in serum of blood was estimated at progressing forms of an ovarian cancer. At primary patients with ovarian cancer at the I-IV clinical stage of a disease (on FIGO) and healthy, except level of TNF-, IFN- and IL-1 in blood serum. To fabrics of primary tumor carried out a quantimeter of components, and also estimated level of an expression of mt p53 and bcl-2. It is established that in the course of progressing of neoplasma at ovarian cancer can be integrated into the main homeostatic processes of a macroorganism thanks to regional and system functions cytokine, including secreted by a tumor - TNF, IFN- and IL-1. The most significant for strengthening of biological potential of a tumor are their such effects, as stimulation of a proliferation of tumoral cages and formation of vessels in a zone of tumoral growth.

Key words: ovarian cancer, cytokine, p53, bcl-2, Ki-67, PCNA

Inna Antoneeva, Doctor of Medicine, Professor of Oncology and Radiology Department. E-mail: aii72@mail.ru

Tatiana Gening, Doctor of Biology, Professor, Head at the Physiology and Pathophysiology Department of the Faculty of Medicine, Head at the Molecular and Cell Biology Laboratory, Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa. E-mail: Naum-53@yandex.ru

Tatiana Abakumova, Candidate of Biology, Associate Professor at the Physiology and Pathophysiology Department, Senior Research Fellow at the Molecular and Cell Biology Laboratory, Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa. E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Snezhanna Gening, 5th year Student of Medical Faculty, Trainee Researcher of the Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa. E-mail: sgening@bk.ru