

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИМИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ ЯИЧНИКОВ

В присутствии аутосыворотки изучена продукция ИЛ1 β , ИЛ2, ИЛ4, ИЛ6 и ФНО α мононуклеарными клетками, инфильтрирующими эпителиальные опухоли яичников 50 женщин больных доброкачественными опухолями, 30 больных пограничными опухолями и 50 больных раком яичников. Установлено, что продукция ИЛ1 β , ФНО α и ИЛ6 мононуклеарными клетками, инфильтрирующими эпителиальные опухоли яичников, возрастает при малигнизации доброкачественных опухолей и снижении степени дифференцировки клеток рака яичников.

При малигнизации доброкачественных опухолей и снижении степени дифференцировки клеток рака яичников выявлено снижение базальной и стимулированной продукции ИЛ2, а также стимулированной продукции ИЛ4 мононуклеарами, инфильтрирующими опухоль. Полученные данные позволяют констатировать повышение активности мононуклеарных фагоцитов, инфильтрирующих эпителиальные опухоли яичников, в процессе их прогрессирования, а также снижение активности Т-клеточной иммунной реакции 1 и 2 типа в ткани опухолей этой локализации. Одной из возможных причин снижения клеточного иммунитета на тканевом уровне у больных опухолями яичников может быть повышенная продукция мононуклеарными клетками цитокинов, замыкающих иммунные реакции, в частности ИЛ6.

Роль отдельных цитокинов в механизмах противоопухолевого иммунитета, а также возможности применения их в лечении опухолей разной локализации активно изучается на протяжении 20 лет [3]. Несмотря на это, особенности цитокинового обмена у больных эпителиальными опухолями яичников (ЭОЯ) изучены недостаточно. Имеющиеся литературные данные, посвященные этой проблеме, немногочисленны и неоднозначны. Большинством авторов, в том числе и нами, оценивался уровень цитокинов в сыворотке крови больных ЭОЯ и особенности их продукции иммунокомпетентными клетками периферической крови [4, 7, 9]. В то же время продукция цитокинов мононуклеарными клетками (МНК), инфильтрирующими ЭОЯ, практически не изучена, что не позволяет достоверно оценить их функциональную активность на финальном этапе реализации противоопухолевого иммунитета [8, 10].

Цель исследования

Изучить продукцию отдельных цитокинов МНК, инфильтрирующими эпителиальные опухоли яичников, в том числе интерлейкина-1 β (ИЛ1 β) и фактора некроза опухоли- α (ФНО α), как цитокинов, обладающих противоопухолевой активностью и отражающих функциональное состояние мононуклеарных фагоцитов в смешанной культуре клеток, а также ИЛ2 и ИЛ4 — цитокинов, опосредующих противоопухолевую клеточную реакцию Т-лимфоцитов по 1 или 2 типу, и ИЛ6 — как цитокина, замыкающего реакции клеточного иммунитета.

Методы исследования

Были изучены особенности спонтанной и стимулированной продукции цитокинов мононуклеарами, изолированными из ткани ЭОЯ, у 130 пациенток, находившихся на лечении в Ставропольском краевом онкологическом диспансере в период с 1998 по 2000 гг.

После клинического обследования, проведения УЗИ, КТ и гистологического исследования образцов удаленных опухолей все больные были распределены на 4 группы: 50 больных доброкачественными эпителиальными опухолями яичников, 30 — пограничными опухолями яичников, 20 — высокодифференцированным раком яичников и 30 — умеренно- и низкодифференцированным раком.

Степень дифференцировки клеток рака яичников оценивалась по методике, предложенной Г. Г. Автандиловым (1996) [1] и адаптированной нами относительно ЭОЯ. Учитывались площадь ядер опухолевых клеток, их плоидность, а также параметры активности областей организаторов ядрышек.

Изолированную из опухоли культуру МНК получали по методике, описанной Н. В. Чердынцевой и соавт. (1997) [5]. Для этого опухолевую ткань измельчали на кусочки размером 1 x 1 x 1 мм, затем инкубировали в ферментном коктейле, содержащем 0,01% коллагеназы (0,37 ЕД/мг «Serva»), 0,01% дезоксирибонуклеазы II (262 КЕД/мг, «Serva») в течение 30 мин на магнитной мешалке в пластиковом стаканчике объемом 50мл при 37 °С. Полученную клеточную суспензию

дважды отмывали от ферментов средой Хенкса и ресуспендировали в среде 199 [4].

Выделение мононуклеарных клеток из полученной клеточной суспензии осуществлялось на градиенте плотности Ficoll-Raque ($\rho = 1,077$ г/мл) производства «Pharmacia Fine Chemicals» (Швеция) по методу, описанному Вуит (1968) [6].

Культивирование мононуклеарных клеток, инфильтрирующих опухоль с целью моделирования условий, приближенных к внутренней среде организма, проводили по методике, предложенной Н. М. Бережной и соавт. (1993 г.) [2]. Для этого к клеточной суспензии, содержащей МНК в конечной концентрации 2×10^6 /мл среды 199, добавляли 10% ауто-сыворотки обследованных женщин и 40 мкг/мл гентамицина. Для оценки стимулированной продукции цитокинов в полученные клеточные суспензии добавляли по 20 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА) производства АОО «Пан Эко» (Россия). Клеточные суспензии инкубировали в течение 24 часов при 37 °С и 100% влажности в атмосфере 5% CO₂. После истечения срока культи-

вирования супернатанты очищали центрифугированием при 800 g в течение 30 мин, собирали в стерильные пластиковые пробирки типа «Эппендорф» и хранили до тестирования при - 30 °С не более 6 мес.

Уровень цитокинов в культуральных средах определялся методом твердофазового иммуноферментного анализа (ИФА) на планшетном фотометре «Labsystems iEMS Reader MF» (Финляндия) с помощью наборов реагентов ТОО «Протеиновый контур» (Россия). По данным титрования стандартных образцов строились калибровочные графики для каждого из цитокинов, по которым определялась концентрация ИЛ1 β , ИЛ2, ИЛ4, ИЛ6 и ФНО α в исследуемых образцах.

Статистическая обработка полученных данных проводилась на компьютере PENTIUM II-300, с использованием программы «Primer Biostatistic 4.03» для Windows'95. Для всех показателей полученных у женщин основной и контрольной группы определялись средние значения (M), а также стандартная ошибка среднего (m). Для оценки достоверности различий между значениями использовался

критерий Стьюдента. Различия между показателями считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

По нашим данным (табл. 1), спонтанная и стимулированная продукция ИЛ1 β мононуклеарными, инфильтрирующими опухоль возрастает в процессе малигнизации доброкачественных опухолей яичников и снижения степени дифференцировки клеток рака. Однако, способность МНК опухоли отвечать на стимуляцию ФГА повышением уровня продукции этого цитокина резко снижена у всех больных ЭОЯ. Так, в ответ на стимуляцию мононуклеарные клетки, выделенные из доброкачественных и пограничных опухолей яичников, не отвечают достоверным повышением продукции ИЛ1 β , а МНК, выделенные из рака яичников, отвечают достоверным снижением уровня продукции этого цитокина.

Похожая закономерность отмечается и в отношении синтеза ФНО α (табл. 1.), однако, увеличение уровня продукции этого цитокина МНК опухоли отмечается, начиная с рака яичников, и

Таблица 1

Спонтанная и стимулированная продукция ИЛ1 β и ФНО α мононуклеарными клетками, инфильтрирующими ЭОЯ

	ИЛ1 β , пкг/мл		ФНО α , пкг/мл	
	Спонтанная продукция (M \pm m)	Стимулированная продукция (M \pm m)	Спонтанная продукция (M \pm m)	Стимулированная продукция (M \pm m)
Доброкачественные опухоли яичников (n=50)	87,5 \pm 2,9	92,1 \pm 18,9	56,9 \pm 1,9	61,5 \pm 3,3
Пограничные опухоли яичников (n=30)	94,9 \pm 10,5*	97,0 \pm 11,6*	63,5 \pm 3,7	68,9 \pm 9,7
Высокодифференцированный рак (n=20)	142,2 \pm 12,6**	111,9 \pm 15,1* ↓	68,3 \pm 3,8*	72,3 \pm 5,0
Умеренно- и низкодифференцированный рак (n=30)	181,5 \pm 12,7***	131,1 \pm 12,3** ↓	91,5 \pm 3,6***	100,3 \pm 4,5***

* отличия от доброкачественных опухолей яичников ($p < 0,05$);

** отличия от доброкачественных и пограничных опухолей яичников ($p < 0,05$);

*** отличия от доброкачественных, пограничных опухолей и высокодифференцированного рака яичников ($p < 0,05$);

↑ ↓ достоверное повышение или снижение стимулированной продукции цитокинов МНК ($p < 0,05$).

Таблица 2

Спонтанная и стимулированная продукция ИЛ2 мононуклеарными клетками, инфильтрирующими ЭОЯ		
	ИЛ2, МЕ/мл	
	Спонтанная продукция (M±m)	Стимулированная продукция (M±m)
Доброкачественные опухоли яичников (n=50)	108,8±1,5	114,9±2,4 ↑
Пограничные опухоли яичников (n=30)	98,2±1,0*	104,5±2,4* ↑
Высокодифференцированный рак (n=20)	97,3±1,1*	99,2±2,5*
Умеренно- и низкодифференцированный рак (n=30)	88,7±1,3***	86,6±2,4***

Таблица 3

Спонтанная и стимулированная продукция ИЛ4 мононуклеарными клетками, инфильтрирующими ЭОЯ		
	ИЛ4, пкг/мл	
	Спонтанная продукция (M±m)	Стимулированная продукция (M±m)
Доброкачественные опухоли яичников (n=50)	32,4±1,4	38,7±1,9 ↑
Пограничные опухоли яичников (n=30)	32,1±0,7	29,6±1,4*
Высокодифференцированный рак (n=20)	32,6±1,4	30,3±1,5*
Умеренно- и низкодифференцированный рак (n=30)	29,7±0,9	26,1±0,8*** ↓

Таблица 4

Спонтанная и стимулированная продукция ИЛ6 мононуклеарными клетками, инфильтрирующими ЭОЯ		
	ИЛ6, пкг/мл	
	Спонтанная продукция (M±m)	Стимулированная продукция (M±m)
Доброкачественные опухоли яичников (n=50)	957,7±12,9	1483,0±103,6 ↑
Пограничные опухоли яичников (n=30)	996,3±58,6	1173,6±134,4
Высокодифференцированный рак (n=20)	1406,0±124,1**	1206,0±110,2
Умеренно- и низкодифференцированный рак (n=30)	1550,0±177,6**	1257,2±168,5

* отличия от доброкачественных опухолей яичников (p<0,05);

** отличия от доброкачественных и пограничных опухолей яичников (p<0,05);

*** отличия от доброкачественных, пограничных опухолей и высокодифференцированного рака яичников (p<0,05);

↑ ↓ достоверное повышение или снижение стимулированной продукции цитокинов МНК (p<0,05).

прогрессирует со снижением степени дифференцировки его клеток. При этом, стимулированная продукция ФНОα достоверно не отличается от спонтанной ни в одной из групп больных.

Полученные данные относительно продукции ИЛ1β и ФНОα МНК больных ЭОЯ подтверждают факт увеличения цитотоксического потенциала мононуклеарных фагоцитов, инфильтрирующих опухоль у этих больных, прогрессирующую в процессе малигнизации доброкачественных опухолей и снижения степени дифференцировки клеток рака яичников. Отсутствие ответа МНК доброкачественных и пограничных опухолей в ответ на стимуляцию ФГА указывает на достижение ими максимальной активности, а снижение синтеза ИЛ1β и ФНОα мононуклеарами, инфильтрирующими рак яичников, указывает на декомпенсацию противоопухолевой цитотоксичности мононуклеарных фагоцитов.

При изучении продукции МНК, выделенными из ткани опухоли, ИЛ2 (табл. 2.) нами установлено, что спонтанная и стимулированная продукция этого цитокина снижается при малигнизации доброкачественных опухолей и уменьшении степени дифференцировки рака яичников. При этом, только МНК доброкачественных и пограничных опухолей отвечают увеличением стимулированной продукции ИЛ2, а мононуклеары рака яичников на стимуляцию ФГА достоверно не реагируют. Это убедительно указывает на снижение активности Т-хелперов 1 типа в реализации противоопухолевого иммунитета при малигнизации доброкачественных опухолей и прогрессирование рака яичников.

В отличие от ИЛ2, базальная продукция ИЛ4 (табл. 3.) мононуклеарными клетками опухоли достоверно не отличалась у больных ЭОЯ вне зависимости от характера опухолевого процесса. В то же время стимулированная продукция ИЛ4 достоверно сни-

жается в процессе малигнизации доброкачественных опухолей, причем это снижение достигает своего максимума в ткани умеренно- и низкодифференцированного рака яичников. Эти данные показывают, что активность Т-хелперов 2 типа остается стабильно высокой в ткани опухолей яичников с низким пролиферативным потенциалом опухолевых клеток, а при увеличении клеточной пролиферации в умеренно- и низкодифференцированном раке — снижается.

Полученные данные, относительно продукции ИЛ2 и ИЛ4 МНК, инфильтрирующими ЭОЯ показывают, что снижение активности Т-хелперов 1 типа в этих опухолях возникает, начиная с самых ранних этапов их малигнизации, причем это снижение нарастает в процессе прогрессирования опухоли. В то же время активность Т-хелперов 2 типа в ткани ЭОЯ остается на достаточно высоком уровне, вплоть до возникновения умеренно- и низкодифференцированного рака яичников с крайне высоким пролиферативным потенциалом опухолевых клеток.

По нашим данным (табл. 4.), спонтанная продукция ИЛ6 мононуклеарами ЭОЯ возрастает только в раке яичников, вне зависимости от степени дифференцировки его клеток. Стимулированная продукция ИЛ6 не зависит от характера опухолевого роста и достоверно возрастает по сравнению с базальной только в доброкачественных опухолях яичников.

Подобная парадоксальная реакция МНК, инфильтрирующих ЭОЯ, в отношении продукции ИЛ6 в ответ на неспецифическую иммуностимуляцию может быть объяснена достижением максимальной активности клеток, продуцирующих эти цитокины, и истощением их компенсаторных возможностей.

Выводы

1. Функциональная активность мононуклеарных фагоцитов, инфильтрирующих ЭОЯ возрастает при малигнизации доброкачественных опухолей и снижении степени дифференцировки рака яичников, что подтверждается повышением продукции этими клетками ИЛ1 β и ФНО α .

2. В процессе малигнизации доброкачественных опухолей яичников наблюдается снижение активности преимущественно Т-хелперов 1 типа, которое нарастает в процессе увеличения пролиферации опухолевых клеток.

3. Нарушение активности Т-хелперов 2 типа возникает только в ткани умеренно- и низкодифференцированного рака яичников, клетки которого обладают наибольшей пролиферативной активностью.

4. Высокий уровень продукции мононуклеарными клетками, инфильтрирующими опухоль ИЛ6 может быть одной из причин, тормозящих синтез цитокинов, обладающих противоопухолевой активностью, и ведущих к снижению противоопухолевого иммунитета у больных ЭОЯ на тканевом уровне.

Литература

1. Автандилов Г. Г. Компьютерная микротелефотометрия в диагностической гистопатологии. — М.: РМАПО, 1996. — 256 с.

2. Бережная Н. М., Ковальчук Б. В., Осипова Е. В. Влияние продуктов культивирования опухолевых клеток различного гистогенеза на функциональную активность лимфоцитов крови человека и зависимости от чувствительности опухолевых биоптатов к ИЛ-2. // Экспериментальная онкология. — 1993. — Том. 10, № 3. — С. 46–50.

3. Возианов А. Ф., Бутенко А. К., Зак К. П. Цитокины. Биологические

и противоопухолевые свойства. — Киев.: Наукова думка, 1998. — 317 с.

4. Павлов Р. В., Аксененко В. А., Криворучко А. Ю., Павленко Н. А. Продукция цитокинов лимфоцитами периферической крови больных эпителиальными опухолями яичников. // Журнал акушерства и женских болезней. — Выпуск 1, — том XLX, — 2001. — С. 37–40.

5. Чердынцева Н. В., Полушина О. А., Кусмарцев С. А., Васильев Н. В. Сравнительная характеристика цитостатической и мембранотоксической опухолеассоциированных лимфоцитов. // Иммунология — 1997. — № 3. — С. 55–57.

6. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 1968. — Vol. 21, № 3 — P. 77–82.

7. Cohen S. B., Wattiez A., Stockheim D., Seidman D. S., Lidor A. L., Mashiach S., Goldenberg M. The accuracy of serum interleukin-6 and tumour necrosis factor as markers for ovarian torsion. // Hum. Reprod. — 2001. — Vol. 16, № 10. — P. 2195–2197.

8. Kryczek I., Grybos M., Karabon L., Klimczak A., Lange A. IL-6 production in ovarian carcinoma is associated with histiotype and biological characteristics of the tumour and influences local immunity. // Br. J. Cancer. — 2000. — Vol. 82, № 3. — P. 621–628.

9. Nash M. A., Ferrandina G., Gordinier M., Loercher A., Freedman R. S. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. // Endocr Relat Cancer. — 1999. — Vol. 6, № 1. — P. 93–107.

10. Schöndorf T., Engel H., Kurbacher C. M., Brenne U., Kolhagen H., Gëohring U. J., Scharl A., Mallmann P. Immunologic features of tumor-infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes in ovarian cancer patients. // J. Soc. Gynecol. Investig. — 1998. — Vol. 5, № 2. — P. 102–107.