УДК 577.2.04:616-006.66:616-092.4

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СУПЕРНАТАНТОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОПУХОЛИ ПРИ ИНВАЗИВНОМ ПРОТОКОВОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кунц Т.А.[1], Карпухина К.В.[2], Михайлова Е.С.[1,2], Вараксин Н.А.[3], Аутеншлюс А.И.[1,2]

[1]ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, e-mail: tkunts@ngs.ru;
[2]ФБГНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», Новосибирск;
[3]АО «Вектор-Бест», Новосибирская область

У больных инвазивным протоковым раком молочной железы проведен сравнительный анализ цитокинового профиля супернатантов клеток периферической крови и опухоли при воздействии на них поликлональных активаторов (ПА). Выявлено достоверное повышение индекса влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию клетками крови изученных цитокинов за исключением IL-18 по сравнению с ИВПА на их продукцию клетками опухоли и ее микроокружения. Значительное повышение концентрации большинства цитокинов, продуцируемых иммунокомпетентными клетками (ИКК) крови после воздействия ПА, по сравнению с клетками опухоли свидетельствовало об их высоком цитокинпродуцирующем потенциале. Клетки опухоли и ее микроокружения уже имели повышенный уровень спонтанной продукции цитокинов, которые обеспечивали ее рост и прогрессию, поэтому активация ПА не давала такого увеличения их концентрации в супернатанте опухоли, что обусловливало более низкие значения ИВПА на продукцию цитокинов клетками опухоли по сравнению с ИКК крови.

Ключевые слова: цитокины, поликлональные активаторы, инвазивный протоковый рак, молочная железа.

CYTOKINE PATTERN OF SUPERNATANT OF BLOOD IMMUNOCOMPETENT CELLS AND TUMOR AT INVASIVE DUCTAL CARCINOMA OF THE BREAST

Kunts T.A.[1], Karpukhina K.V.[2], Mikhaylova E.S.[1,2], Varaksin N.A.[3], Autenshlyus A.I.[1,2]

[1]Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, e-mail: tkunts@ngs.ru;
[2]Institute of molecular biology and biophysics, Novosibirsk;
[3]JSC «Vector-Best», Novosibirsk region

Cytokine patterns of supernatants of peripheral blood cells and tumor exposed to polyclonal activators (PA) was investigated in patient with invasive ductal carcinoma of the breast, and comparative analysis was carried out. Significant increase of stimulation indexes of polyclonal activators (SIPA) for cytokine expression by blood cells, except IL-18, compared with SIPA for cytokine expression by tumor and its microenvironment were revealed. An increase in concentrations of most cytokines produced by blood immunocompetent cells exposured to PA, compared to tumor cells, demonstrated high cytokine-producing potential. Tumor and its microenvironment have already had increased levels of spontaneous production of cytokines that provided growth and progression of the tumor. Therefore, PA activation did not lead to such cytokine concentration increase in tumor supernatant. This could be the reason of lower values of SIPA on cytokine expression by tumor cells compared to blood immunocompetent cells.

Keywords: cytokines, polyclonal activators, invasive ductal carcinoma, breast.

Цитокины и факторы роста, продуцируемые как самой опухолью, так и ИКК, составляющими ее микроокружение, играют важную роль в патогенезе злокачественных новообразований [1,7]. Благодаря своим разнообразным функциям, цитокины могут оказывать как проонкогенное действие, участвуя в поддержании воспаления и тем самым способствуя прогрессии опухоли, но и, будучи задействованными в различных молекулярно-биологических механизмах, демонстрируют и противоопухолевый эффект, непосредственно или косвенно влияя на дифференцировку, апоптоз опухолевых клеток [2, 3, 6, 8]. Поскольку

цитокины относятся к факторам централизованной регуляции иммунных процессов во всем организме, их продукция иммунокомпетентными клетками крови так или иначе взаимосвязана с процессами, протекающими локально в месте развивающегося новообразования. Интерес представляет сравнительный анализ цитокинпродуцирующего потенциала клеток опухоли и цитокинпродуцирующего потенциала иммунокомпетентных клеток крови, который может быть выявлен при воздействии на них поликлональных активаторов (ПА).

Целью настоящего исследования явилось определение цитокинового профиля супернатантов клеток периферической крови, опухоли и ее микроокружения при воздействии на них поликлональных активаторов у больных инвазивным протоковым раком молочной железы.

Материал и методы исследования

Материалом исследования служила периферическая кровь и биоптаты опухолей 54 женщин с инвазивным протоковым раком, являющимся по гистологическому типу аденокарциномой. Для оценки цитокинпродуцирующего потенциала ИКК крови, опухоли и ее микроокружения применяли комплекс ПА, состоящий из фитогемагглютинина в концентрации 4 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида в концентрации 2 мкг/мл. В исследовании использовали стандартизованный набор реагентов «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ» производства ЗАО «Вектор-Бест». Одну часть клеток крови пациента инкубировали в питательной среде DMEM-F12 (для определения спонтанной продукции), а другую – в таком же объеме среды с комплексом ПА для определения индуцированной продукции цитокинов при 37 ºС в течение 24 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин, 15 мин, получали супернатант, в котором проводили определение концентрации цитокинов.

Биоптаты опухолей, полученные методом трепанобиопсии объемом 8 мм^3, получали специальным устройством и помещали в 2 флакона, в одном из которых находилась только питательная среда DMEM-F12 (спонтанная продукция), а в другом – раствор ПА в таком же объеме среды (продукция, индуцированная ПА) [4]. После инкубирования при 37 ºС в течение 72 ч опухоль извлекали из среды и фиксировали в растворе формалина для дальнейших гистологических исследований. Для получения очищенного супернатанта оставшиеся клетки опухоли осаждали центрифугированием при 2000 об/мин, 15 мин. В супернатантах, после осаждения клеток крови и опухоли, с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1β, IL-1Ra, TNFα, IFNγ, G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов),

MCP-1 (моноцитарный хемотаксический протеин-1) с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест».

При определении концентрации ряда цитокинов было установлено, что их уровень находился на нижней границе чувствительности тест-системы. Это касается, в первую очередь, концентрации IL-2, IL-17 и IFNγ в супернатанте ИКК периферической крови. ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови, а также опухолью и ее микроокружением высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А − уровень стимулированной поликлональными активаторами продукции цитокина, Б − уровень спонтанной продукции цитокина.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Показатели выражали в виде медианы – Ме, нижнего и верхнего процентилей (25; 75), рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r) и его достоверность (p).

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение влияния поликлональных активаторов (ПА) на продукцию цитокинов ИКК крови и опухоли у больных инвазивным протоковым раком показало достоверное повышения ИВПА на продукцию клетками крови почти всех цитокинов за исключением IL-18, по сравнению с клетками опухоли (табл. 1).

Таблица 1

Индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов клетками периферической крови и опухоли у больных с инвазивным протоковым раком

Цитокин	Исследуемые группы	
	1. ИКК крови, n=66	2. Клетки опухоли и ее микроокружения, n=54
	Ме (25–75-й процентиль)	Ме (25–75-й процентиль)
IL-2	7,90 (3,25; 14,83); p_{1-2}=0,0001	1,88 (1,00; 4,40)
IL-6	59,95 (20,43; 250,19); p_{1-2}=0,0001	2,26 (1,05; 2,79)
IL-8	24,15 (5,20; 58,90); p_{1-2}=0,0001	1,60 (0,88; 2,47)
IL-10	40,80 (16,10; 64,30); p_{1-2}=0,0001	1,27 (0,77; 2,73)
IL-17	23,10 (9,98; 51,35); p_{1-2}=0,0001	1,30 (0,79; 3,50)
IL-18	1,30 (1,11; 1,41); p_{1-2}=0,001	1,88 (1,15; 3,22)
IL-1β	39,71 (14,97; 94,35); p_{1-2}=0,0001	11,28 (5,53; 38,03)
IL-1Ra	12,03 (8,05; 15,93); p_{1-2}=0,0001	1,76 (0,99; 3,76)
TNFα	33,74 (5,86; 127,63); p=0,0001	3,43 (1,50; 7,61)
INFγ	168,15 (0,36; 600,30); p_{1-2}=0,0001	1,24 (0,66; 2,86)
G-CSF	66,45 (20,71; 284,95); p_{1-2}=0,0001	1,11 (0,96; 2,12)
GM-CSF	19,95 (7,64; 33,77); p_{1-2}=0,0001	3,15 (1,50; 7,59)
VEGF	2,50 (1,70; 3,54); p_{1-2}=0,0001	0,60 (0,40; 1,09)
MCP-1	1,29 (0,50; 2,83)	1,00 (0,51; 2,05)

Такое различие обусловлено способностью опухоли и ее микроокружения продуцировать цитокины, что выражалось в изначально высоком уровне спонтанной продукции IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1Ra, IFNγ, G-CSF, GM-CSF и VEGF по сравнению со спонтанной продукцией ИКК крови (табл. 2).

Таблица 2

Спонтанная продукция цитокинов ИКК периферической крови и опухолью у больных с инвазивным протоковым раком молочной железы

Цитокин (пкг/мл)	Исследуемые группы	
	1. ИКК крови, n=66	2. Клетки опухоли и ее микроокружения, n=54
	Me (25-75-й процентиль)	Me (25-75-й процентиль)
IL-2	2,00 (2,00; 2,00); p_{1-2}=0,0001	2,00 (2,00; 3,08)
IL-6	160,50 (57,45; 515,60); p_{1-2}=0,0001	45000,00 (28000,00; 64795,00)
IL-8	672,50 (348,75; 3757,50); p_{1-2}=0,0001	24410,00 (14045,00; 38100,00)
IL-10	2,60 (1,00; 5,83); p_{1-2}=0,0001	11,25 (5,33; 18,15)
IL-17	2,00 (2,00; 2,00); p_{1-2}=0,0001	2,25 (2,00; 5,68)
IL-18	24,55 (18,95; 31,00); p_{1-2}=0,0001	94,75 (42,63; 246,65)
IL-1β	39,90 (15,45; 96,35)	43,10 (21,60; 92,88)
IL-1Ra	557,50 (463,40; 939,78); p_{1-2}=0,0001	9017,50 (2362,05; 18858,75)
TNFα	10,60 (3,58; 21,43)	12,00 (7,35; 22,93)
INFγ	2,00 (2,00; 2,00); p_{1-2}=0,0001	10,35 (7,13; 23,63)
G-CSF	13,00 (2,00; 39,80); p_{1-2}=0,0001	1982,50 (618,50; 2917,50)
GM-CSF	2,30 (2,00; 7,50); p_{1-2}=0,0001	40,60 (17,75; 75,15)
VEGF	53,55 (32,15; 86,08); p=0,0001	2624,70 (1838,55; 4134,20)
MCP-1	2710,50 (1204,20; 7600,18)	3630,25 (1420,95; 8477,65)

При добавлении ПА в среду культивирования ИКК крови и опухоли в супернатанте последней отмечалось повышение продукции большинства цитокинов за исключением MCP-1, продукция которого осталась без изменений, и продукции VEGF, которая снизилась (табл. 3). Что касается влияния ПА на продукцию цитокинов ИКК крови, то была выявлена выраженная реакция клеток на ПА по сравнению с аналогичной реакцией опухоли и ее микроокружения (табл. 4). Так, концентрации цитокинов в супернатанте ИКК крови после добавления ПА достигали повышения на 1–2 порядка (табл. 5).

Таблица 3

Влияние поликлональных активаторов на продукцию цитокинов опухолью у больных с инвазивным протоковым раком

Цитокин (пкг/мл)	Исследуемые группы, n=54	
	Спонтанная продукция	Продукция после воздействия ПА

	Me (25–75-й процентиль)	Me (25–75-й процентиль)
IL-2	2,00 (2,00; 3,08); p_{1-2}=0,0001	5,00 (2,00; 9,55)
IL-6	45000,00 (28000,00; 64795,00); p_{1-2}=0,0001	103725,00 (31112,50; 153412,50)
IL-8	24410,00 (14045,00; 38100,00); p_{1-2}=0,014	41275,00 (16762,50; 60225,00)
IL-10	11,25 (5,33; 18,15)	13,35 (4,00; 37,00)
IL-17	2,25 (2,00; 5,68); p_{1-2}=0,001	5,60 (2,70; 14,50)
IL-18	94,75 (42,63; 246,65); p_{1-2}=0,001	236,25 (96,75; 462,68)
IL-1β	43,10 (21,60; 92,88); p_{1-2}=0,0001	595,00 (386,25; 901,25)
IL-1Ra	9017,50 (2362,05; 18858,75); p_{1-2}=0,0001	15782,35 (10660,00; 27491,25)
TNFα	12,00 (7,35; 22,93); p_{1-2}=0,0001	43,55 (17,50; 82,13)
INFγ	10,35 (7,13; 23,63); p_{1-2}=0,005	20,30 (8,78; 52,83)
G-CSF	1982,50 (618,50; 2917,50)	2763,00 (1276,65; 2919,75)
GM-CSF	40,60 (17,75; 75,15); p_{1-2}=0,0001	129,35 (58,13; 228,25)
VEGF	2624,70 (1838,55; 4134,20); p_{1-2}=0,001	1755,00 (899,30; 3108,90)
MCP-1	3630,25 (1420,95; 8477,65)	2710,00 (1440,30; 12552,75)

Таблица 4

Продукция цитокинов ИКК периферической крови и опухолью у больных с инвазивным протоковым раком молочной железы после воздействия поликлональных активаторов

Цитокин (пкг/мл)	Исследуемые группы	
	3. ИКК крови, n=66	4. Клетки опухоли и ее микроокружения, n=54
	Me (25–75-й процентиль)	Me (25–75-й процентиль)
IL-2	15,85 (6,50; 31,63); p_{1-2}=0,0001	5,00 (2,00; 9,55)
IL-6	12675,00 (9287,50; 17587,50); p_{1-2}=0,0001	103725,00 (31112,50; 153412,50)
IL-8	16775,00 (24450,00; 27562,50); p_{1-2}=0,0001	41275,00 (16762,50; 60225,00)
IL-10	93,85 (63,30; 139,98); p_{1-2}=0,0001	13,35 (4,00; 37,00)
IL-17	41,40 (18,43; 101,35); p_{1-2}=0,0001	5,60 (2,70; 14,50)
IL-18	31,85 (25,28; 38,63); p_{1-2}=0,0001	236,25 (96,75; 462,68)
IL-1β	1472,50 (1032,50; 2761,25); p=0,0001	595,00 (386,25; 901,25)
IL-1Ra	8067,90 (6073,30; 10121,70); p_{1-2}=0,0001	15782,35 (10660,00; 27491,25)
TNFα	1069,00 (647,50; 1513,00); p_{1-2}=0,0001	43,55 (17,50; 82,13)
INFγ	816,00 (306,08; 1328,68); p_{1-2}=0,0001	20,30 (8,78; 52,83)
G-CSF	746,70 (621,60; 986,70); p_{1-2}=0,0001	2763,00 (1276,65; 2919,75)

GM-CSF	84,35 (47,55; 129,45); p_{1-2}=0,013	129,35 (58,13; 228,25)
VEGF	118,55 (87,80; 185,55); p_{1-2}=0,0001	1755,00 (899,30; 3108,90)
MCP-1	4289,80 (3028,13; 5450,40)	2710,00 (1440,30; 12552,75)

Таблица 5

Влияние поликлональных активаторов на продукцию цитокинов периферической кровью у больных с инвазивным протоковым раком

Цитокин (пкг/мл)	Исследуемые группы пациентов, n=66	
	Спонтанная продукция	Продукция после воздействия ПА
	Me (25–75-й процентиль)	Me (25–75-й процентиль)
IL-2	2,00 (2,00; 2,00); p_{1-2}=0,0001	15,85 (6,50; 31,63)
IL-6	160,50 (57,45; 515,60); p_{1-2}=0,0001	12675,00 (9287,50; 17587,50)
IL-8	672,50 (348,75; 3757,50); p_{1-2}=0,0001	16775,00 (24450,00; 27562,50)
IL-10	2,60 (1,00; 5,83); p_{1-2}=0,0001	93,85 (63,30; 139,98)
IL-17	2,00 (2,00; 2,00); p_{1-2}=0,0001	41,40 (18,43; 101,35)
IL-18	24,55 (18,95; 31,00); p_{1-2}=0,001	31,85 (25,28; 38,63)
IL-1β	39,90 (15,45; 96,35); p_{1-2}=0,0001	1472,50 (1032,50; 2761,25)
IL-1Ra	557,50 (463,40; 939,78); p_{1-2}=0,0001	8067,90 (6073,30; 10121,70)
TNFα	10,60 (3,58; 21,43); p_{1-2}=0,0001	1069,00 (647,50; 1513,00)
INFγ	2,00 (2,00; 2,00); p_{1-2}=0,0001	816,00 (306,08; 1328,68)
G-CSF	13,00 (2,00; 39,80); p_{1-2}=0,0001	746,70 (621,60; 986,70)
GM-CSF	2,30 (2,00; 7,50); p_{1-2}=0,0001	84,35 (47,55; 129,45)
VEGF	53,55 (32,15; 86,08); p_{1-2}=0,0001	118,55 (87,80; 185,55)
MCP-1	2710,50 (1204,20; 7600,18)	4289,80 (3028,13; 5450,40)

Значительное повышение концентрации большинства цитокинов, продуцируемых ИКК крови после воздействия ПА, по сравнению с клетками опухоли, свидетельствовало о высоком цитокинпродуцирующем потенциале клеток периферической крови, в то время как клетки опухоли и ее микроокружения уже имели повышенный уровень спонтанной

продукции цитокинов, которые обеспечивали ее рост и прогрессию [5, 7], поэтому активация ПА не давала такого увеличения их концентрации в супернатанте опухоли.

Выводы

Вышеизложенные данные объясняют более низкие значения ИВПА на продукцию цитокинов клетками опухоли по сравнению с ИКК крови. Дальнейшее изучение взаимосвязей цитокинпродуцирующего потенциала клеток крови и опухоли будет направлено на разработку способов определения тяжести опухолевой прогрессии по уровню цитокинов супернатанта клеток крови еще до проведения инвазивных процедур.

Список литературы

1. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. – Новосибирск, 2014. – 128 с.
2. Bar D., Apte R. N., Voronov E., Dinarello C. A., Cohen S. A continuous delivery system of IL-1 receptor antagonist reduces angiogenesis and inhibits tumor development // Faseb J. – 2004. – V. 18. – P. 161-163.
3. Eissa S.A., Zaki S.A., El-Maghraby S.M., Kadry D.Y. Importance of serum IL-18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression // J. Egypt Natl. Canc. Inst. – 2005. – V. 17. – P. 51-55.
4. Freeman A.E., Hoffman R.M. In vivo-like growth of human tumors in vitro // PNAS. – 1986. – V. 83. – P. 2694-2698.
5. Jain R.K., Fukumura D., Duda D.G. From the guest editors: role of tumor microenvironment in tumor progression and treatment response: A 30 Years' Journey // Cancer Journal. – 2015. – V. 21. – № 4. – P. 235-236.
6. Huang S., Wu M., Shun C., Wang H., Lin M. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma // J. Biomed. Sci. – 2004. – V. 11. – P. 517-527.
7. Man Y., Stojadinovic A., Mason J., Avital I., Bilchik A., Bruecher B., Protic M., Nissan A., Izadjoo M., Zhang X., Jewett A. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories // J. Cancer. – 2013. – V. 4. – № 1. – P. 84-95.
8. McClintock J.Y., Wagner E.M. Role of IL-6 in systemic angiogenesis of the lung // J. Appl. Physiol. – 2005. – V. 99. – № 3. – P. 861-866.