

А.Б. Сагакянц, О.И. Кит, Е.Ю. Златник, Е.И. Золотарев, О.Г. Шульгина, И.А. Новикова, Н.С. Самойленко, Н.В. Солдаткина, Ю.А. Геворкян, Ю.С. Сидоренко

Цитокиновый профиль тканей при неметастатическом раке желудка

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии»
Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

Развитие опухолевого процесса предполагает вовлеченность различных функциональных элементов врожденного и адаптивного иммунитета. Особая роль в реорганизации тканей, изменении и эволюции свойств раковых клеток отводится цитокинам, изучение роли которых в указанных процессах при различных видах неоплазм и в частности при неметастатическом раке желудка представляет актуальную задачу.

Цель работы. Определение особенностей цитокинового статуса в тканях больных с неметастатическим раком желудка.

Материалы и методы. В экстрактах тканей опухоли, перифокальной зоны, сальника, брюшины больных раком желудка без метастазов (Т3-4аN0-3M0, n=20, 58,9±9,7 лет) методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18, ФНО-α, ИЛ-10 и ИЛ-1РА в ткани опухоли, перифокальной зоне, а также в сальнике и брюшине.

Результаты и обсуждение. В ткани опухоли отмечено увеличение содержания ИЛ-1β, ИЛ-8 и снижение ИЛ-2, ФНО-α и ИЛ-10. В перифокальной зоне выявлено снижение концентрации ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 при повышенном содержании ИЛ-2, ИЛ-1РА, ИЛ-10, ФНО-α и ИЛ-18. На этом фоне в сальнике и брюшине по сравнению с опухолью снижена концентрация ИЛ-1β, ИЛ-18 и ИЛ-1РА на фоне повышения концентрации ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО-α и ИЛ-10.

Выводы. Показано, что опухолевая ткань имеет некоторые особенности в цитокиновом профиле по сравнению с непораженными тканями, что может быть использовано для дальнейшей оценки развития патологического процесса.

Ключевые слова: интерлейкины, рак желудка, аденокарцинома, факторы прогноза

Введение

Рак желудка (РЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований. Ежегодно в мире регистрируется око-

ло 800 тыс. новых случаев и 628 тыс. смертей от этого заболевания, а в России в структуре смертности от злокачественных новообразований он занимает второе место [1]. В возникновении данной патологии, характере её протекания важную роль играют клеточные и гуморальные факторы врожденного и адаптивного иммунитета, реализующие свою активность не только на системном, но и, в большей степени, на местном уровне [2].

Канцерогенез опухолей желудка — многостадийный процесс, предполагающий возникновение полиэтиологического воспаления слизистой желудка, атрофических изменений, метаплазии и дисплазии, которые в условиях дисбаланса иммунной системы приводят к онкотрансформации желудочного эпителия [3]. Показано, что взаимодействие иммунологических факторов и опухоли носит сложный, часто противоречивый характер, что нашло отражение в возникновении представлений об иммуноредактировании опухоли, в соответствии с которыми лимфоциты и различные цитокины, находящиеся в ткани, проявляют иммуносупрессивное и ростостимулирующее действие [4].

Многие авторы отмечают неоднозначную роль как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, интерлейкинов (ИЛ) в патогенезе опухолевых процессов [5-8]. Данные регуляторные молекулы могут играть роль не только в возникновении опухолевых клеток, но и в прогрессии опухоли. Например хемокины, к которым относится ИЛ-8, привлекают в область опухоли лимфоциты и макрофаги, среди которых в организме онкологических больных могут преобладать Treg и M-2 — клетки-продуценты цитокинов, таких как VEGF, EGF, TGF-β, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10. Указанные молекулы способны вырабатываться и опухолевыми клетками, чему может способствовать гипоксия, сопровождающая развитие опухоли. Установление особенностей цитокинового статуса в тканях организма пациента при РЖ может быть актуальным как в научном, так и в прогностическом плане.

Целью исследования являлось определение особенностей цитокинового статуса в тканях больных с неметастатическим РЖ.

Материалы и методы

Проведено проспективное исследование, в которое были включены 20 больных РЖ Т3-4aN0-3M0 без метастатического поражения брюшины и большого сальника в возрасте от 30 до 80 лет, средний возраст 58,9±9,7. Всем больным перед операцией проводили стандартное обследование, включающее общеклиническое и биохимическое исследование крови, комплексный анализ показателей свертываемости крови, общий анализ мочи. Плановое обследование включало: обзорную рентгенографию органов грудной клетки, определение функций внешнего дыхания, электрокардиографию. Ведущим инструментальным диагностическим методом являлось ФЭГДС, компьютерная или МР-томография органов брюшной полости и малого таза. Больные давали письменное информированное согласие на проведение исследований.

Непосредственно после оперативного вмешательства осуществляли забор следующих образцов: опухоль (ОП), перифокальная зона (ПЗ), сальник (СА), брюшина (БР). Перечень тканей для исследования определялся особенностью дизайна проводимого исследования — изучение особенностей иммунологического статуса опухоли и наиболее вероятных мест метастазирования (сальник и брюшина).

Забранные ткани ex tempore подвергались дезинтеграции с использованием BD Medimachine в течение 30–60 сек. Полученную клеточную взвесь после фильтрования центрифугировали в течение 4 мин. при 1500 об/мин. в центрифуге Eppendorf 5702 R, отбирали надосадочную жидкость и аликвотировали с последующей консервацией и хранением при -20°C до момента определения цитокинов.

В супернатанте гомогенатов тканей изучали уровни цитокинов, ИЛ методом твердофазного «сэндвич» ИФА: ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18, ФНО-α (фактор некроза опухолей альфа), ИЛ-10 (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, РФ) и рецепторного антагониста ИЛ-1 (ИЛ-1РА, eBioscience, Austria) в соответствии с инструкциями фирмы производителя. Результаты выражали в виде удельного содержания в пересчете на 1 г белка гомогената, оцениваемого биуретовым методом (пг/мл/г белка).

Статистическую обработку данных проводили с использованием статистического пакета STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США). Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения проводили с применением критерия Шапиро-Уилка. Описательная статистика количественных признаков представлена в виде центральной тенденции медианы (Me) и интерквартильного размаха — 25 и 75 процентиля (Me [LQ; UQ]). Достоверность отличий между выборками оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни и Вилкинсона, отличия считали достоверными при p<0.05.

Результаты

В качестве определяемых в биологическом материале молекул выбраны как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины, обладающие способностью реализовывать свою функциональную активность на территории изучаемых тканей. Рассматриваемые молекулы вовлечены в регуляцию процессов пролиферации, дифференцировки и изменения активности клеток, их апоптоза, в реализацию межклеточных и межсистемных взаимодействий, в результате чего могут наблюдаться как провоспалительные, так и противоопухолевые эффекты.

Результаты определения выбранных цитокинов отражены в табл.

Из представленных результатов видно, что при развитии неметастатической формы РЖ имеются определенные особенности цитокинового статуса в изученных опухолевой и неопухолевых тканях.

Так, удельная концентрация отдельных представителей семейства ИЛ-1 имела следующие особенности: отмечено статистически достоверное снижение ИЛ-1β в ПЗ и БР, соответственно на 38% и 74% по сравнению с значением данного показателя в ОП (p<0,05); одновременно с этим в ПЗ выявлено достоверное увеличение ИЛ-18 на 49% по сравнению с ОП (p<0,05) на фоне снижения данного показателя в СА и БР, соответственно на 38% и 20% (p<0,05).

Концентрация рецепторного антагониста ИЛ-1, ИЛ-1РА достоверно превышала значения данного показателя в опухоли на 112% (p<0,05), в то время как в СА и БР этот показатель был ниже ОП на 47% и 48%.

Удельная концентрация ИЛ-6, другого важнейшего провоспалительного цитокина в СА и БР была выше значений в опухолевой ткани в 16 и 15 раз соответственно (p<0.05). На этом фоне в ПЗ по сравнению с опухолью данный показатель был ниже на 45% (p<0.05).

Таблица. Удельное содержание цитокинов в опухоли и образцах тканей при раке желудка без метастатических поражений, пг/мл/г белка

Ткань	ИЛ-1β	ИЛ-2	ИЛ-6	ИЛ-8	ФНО-α	ИЛ-18	ИЛ-10	ИЛ-1РА
	Me (LQ; UQ)	Me (LQ; UQ)	Me (LQ; UQ)	Me (LQ; UQ)	Me (LQ; UQ)	Me (LQ; UQ)	Me (LQ; UQ)	Me (LQ; UQ)
ОП	49,99 ^{2,4} (12; 162)	2,77 ^{3,4} (1,06; 5,0)	10,7 ^{2,3,4} (3,7; 80,2)	43,8 ² (19,4; 107,9)	2,75 ³ (1,0; 3,65)	45,8 ^{2,3,4} (0; 352,7)	2,8 ^{2,3,4} (0; 6,49)	3163,5 ^{2,3,4} (1979,5; 4657,6)
ПЗ	30,5 ¹ (20; 46,9)	5,83 (2,6; 10,4)	5,94 ^{1,3,4} (2,1; 8,9)	11,98 ^{1,3,4} (2,7; 26,7)	4,19 (3,2; 5,39)	68,2 ¹ (36,7; 83)	4,39 ¹ (3,4; 8,8)	6701,6 ^{1,3,4} (5058,9; 12008,3)
СА	10,98 (4,8; 51,6)	9,2 ^{1,4} (3,9; 18,6)	180,3 ^{1,2} (84,6; 347,2)	27,4 ² (9,4; 130,1)	4,6 ¹ (3,4; 7,9)	28,6 ¹ (18; 65,3)	4,2 ¹ (0,9; 24,8)	1666,8 ^{1,2} (691,6; 3461,9)
БР	12,9 ¹ (5,8; 44,5)	5,7 ^{1,3} (2,6; 11,5)	157 ^{1,2} (16,8; 331,8)	44,3 ² (15,3; 116)	4,5 (2,3; 5,96)	36,6 ¹ (11,2; 55,4)	3,3 ¹ (1,2; 14,4)	1635 ^{1,2} (533,8; 3043)

Достоверно по отношению к 1 (ОП); 2 (ПЗ); 3 (СА); 4 (БР), p<0,05; ОП- опухоль; ПЗ – перифокальная зона; СА- сальник; БР-брюшина

В регуляции активности лимфоцитов и активации клеточного иммунитета особая роль отводится ИЛ-2. Концентрация данного цитокина во всех тканях была достоверно выше значений данного показателя в опухоли на 106%, 112% и 232% в БР, ПЗ и СА соответственно.

Концентрация другого провоспалительного цитокина ФНО- α в СА была достоверно выше данного показателя в опухоли соответственно на 67% ($p < 0.05$), статистически не отличаясь от уровня в ПЗ и БР.

На фоне отмеченных особенностей удельной концентрации провоспалительных цитокинов выявлено статистически достоверное увеличение содержания ИЛ-10 во всех тканях по сравнению с данным показателем в опухоли — на 18% в БР, 50% и 57% — в СА и ПЗ соответственно ($p < 0.05$).

Обсуждение

Биологические эффекты цитокинов определяются особенностями их синтеза, распределения и наличия соответствующих клеток-мишеней. Оказывая главным образом локальное действие, реализуя свой эффект пара- и аутокринно, одни и те же цитокины способны приводить к развитию противоположных реакций, зависящих от их соотношения, динамики выработки и целого ряда иных факторов.

В результате проведенного исследования выявлены некоторые особенности цитокинового профиля ряда тканей больных неметастатическим РЖ.

В опухолевой ткани по сравнению с перифокальной зоной, тканями сальника и брюшины повышена концентрация ИЛ-1 β и ИЛ-8, что может быть отражением развития воспалительного процесса с привлечением гетерогенной популяции клеток иммунной системы, в реализации активности которых может превалировать проонкогенный потенциал. ИЛ-1 β , обладая разнообразной функциональной активностью, обуславливает реализацию ряда проопухолевых эффектов: это и стимуляция ангиогенеза (индукция синтеза макрофагами VEGF и ФНО- α), является хемоаттрактантом и активатором для эндотелиальных клеток, это и изменение экспрессии молекул адгезии на опухолевых клетках, запуск синтеза и высвобождения матриксных металлопротеиназ, продукцию различными клетками провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-2, ИЛ-6 и др.), изменение кислород-зависимых процессов активации клеток врожденного иммунитета, что в совокупности приводит к моделированию микроокружения опухолевых клеток [9]. Повышение внутриопухолевой концентрации данных цито-

кинов может способствовать прогрессии опухолевого роста.

На этом фоне в ОП отмечается снижение концентрации активирующей эффекторные клетки ИЛ-2 и регулирующего апоптоз ФНО- α , а также противовоспалительного цитокина ИЛ-10, что в свою очередь может свидетельствовать о наиболее выраженной супрессии иммунного ответа в них.

Обращают на себя внимание выявленные особенности локальной концентрации выбранных цитокинов в непораженных опухолевым процессом тканях.

В прилегающей к опухоли перифокальной зоне отмечено снижение концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 при повышенном содержании ИЛ-2, ИЛ-1РА, ИЛ-10, ФНО- α и ИЛ-18, в то время как в сальнике и брюшине — потенциальных местах метастазирования рака желудка, снижена концентрация ИЛ-1 β , ИЛ-18 и ИЛ-1РА, на фоне повышения концентрации ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО- α и ИЛ-10.

Выводы

Указанные особенности соотношений исследованных цитокинов, по нашему мнению, могут формировать определенный цитокиновый профиль организма больных РЖ, определяя биологические свойства опухоли, характер её взаимоотношения с микроокружением. Определенный интерес представляет сопоставление полученных результатов с концентрацией данных цитокинов в тканях больных с метастатической формой РЖ. Можно предположить, что цитокиновый профиль в условиях генерализации процесса вероятно может иметь свои черты, которые будут отражать формирование премеататической ниши, что позволит выявить вклад отдельных участников в данном явлении и разработать на этой основе новые прогностические факторы развития заболевания.

На фоне отмеченных особенностей удельной концентрации провоспалительных цитокинов выявлено статистически достоверное увеличение содержания ИЛ-10 во всех тканях по сравнению с данным показателем в опухоли: на 18% в БР, 50% и 57% — в СА и ПЗ соответственно ($p < 0.05$).

Финансирование

Работа выполнена в рамках госзадания «Разработка прогностических алгоритмов на основе выявления новых лабораторных факторов прогноза течения злокачественных опухолей» ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава РФ.

Соблюдение этических стандартов

Работа была одобрена этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, протокол № 19/1 от 06.10.2017г. Все пациенты подписывали информированное согласие.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

*A.B. Sagakyants, O.I. Keith, E.Yu. Zlatnik,
E.I. Zolotareva., O.G. Shulina, I.A. Novikova,
N.S. Samoilenko, N.V. Soldatkina, Yu.A. Gevorkyan,
Yu.S. Sidorenko*

Cytokine tissue profile in non-metastatic gastric cancer

National medical research centre for oncology,
Rostov-on-Don

ЛИТЕРАТУРА

- Каприна А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017.
- Сенчукова М.А., Рябов А.Б. Современные представления о факторах прогрессии рака желудка // Онкология. — 2016. — Т. 1. — С. 82-87.
- Матвеева Л.В., Мосина Л.М. Роль цитокинов семейства интерлейкина-1 в желудочном канцерогенезе // Вестник РАМН. — 2012. — Т. 11. — С. 59-65.
- Kim R., Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape // Immunology. — 2007. — Vol. 121(1). — P. 1-14. — doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02587x.
- Szkaradkiewicz A., Karpiński T. M., Drews M. et al. Natural Killer Cell Cytotoxicity and Immunosuppressive Cytokines (IL-10, TGF- β 1) in Patients with Gastric Cancer // J. Biomed. Biotechnol. — 2010. — Vol. 2010. — P. 901564. — doi:10.1155/2010/901564.
- Liang J., Li Y., Liu X. et al. Relationship between cytokine levels and clinical classification of gastric cancer // Asian Pacific J. Cancer Prevention. — 2011. — Vol. 12(7). — P. 1803-6.
- Кит О.И., Никипелова Е.А., Шапошников А.В. и др. Воспаление и рак толстой кишки. Молекулярно-иммунологические механизмы // Вопросы онкологии. — 2018. — Т. 64(1) — С. 34-40.
- Кит О.И., Златник Е.Ю., Базаев А.Л. и др. Особенности локального иммунитета при раке пищевода разной степени дифференцировки // Злокачественные опухоли. — 2016. — Т. 4-S1(21). — С. 207-208.
- Nakao S., Kuwano T., Tsutsumi-Miyahara C. et al. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth // J. Clin. Invest. — 2005. — Vol. 115(11). — P. 2979-91. — doi: 10.1172/JCI23298.

Поступила в редакцию 05.06.2019 г.

The development of the tumor process involves the involvement of various functional elements of innate and adaptive immunity. A special role in the reorganization of tissues, changes and evolution of the properties of cancer cells is given to cytokines, the study of the role of which in these processes with various types of neoplasms and, in particular, with non-metastatic gastric cancer is an urgent task. The aim of the work was to determine the characteristics of the cytokine status in the tissues of patients with non-metastatic gastric cancer. Materials and methods. In the extracts of tumor tissue, perifocal zone, omentum, peritoneum of patients with gastric cancer without metastases (T3-4aN0-3M0, n = 20, 58.9 \pm 9.7 years), the concentration of IL-1 β , IL-2, IL -6, IL-8, IL-18, TNF- α , IL-10 and IL-1RA in tumor tissue, the perifocal zone, as well as in the omentum and peritoneum. Results and discussion. In the tumor tissue, an increase in the content of IL-1 β , IL-8 and a decrease in IL-2, TNF- α and IL-10 were noted. In the perifocal zone, a decrease in the concentration of IL-1 β , IL-6, IL-8 was revealed with an increased content of IL-2, IL-1RA, IL-10, TNF- α and IL-18. Against this background, the omentum and peritoneum compared with the tumor, the concentration of IL-1 β , IL-18 and IL-1RA is reduced, against the background of an increase in the concentration of IL-2, IL-6, TNF- α and IL-10. Findings. It was shown that tumor tissue has some features in the cytokine profile compared with unaffected tissues, which can be used to further evaluate the development of the pathological process.

Key words: interleukins; stomach cancer; adenocarcinoma; prognostic factors