

УДК 576.54:577.29:616-006.66

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ЭНДОГЕННОГО И ЭКЗОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ КРОВИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2020 г. А. И. Аутеншлюс^{1,2,*}, К. И. Давлетова^{1,2}, Е. С. Михайлова^{1,2},
А. В. Проскура², Н. А. Вараксин³, А. П. Богачук⁴, С. В. Сидоров⁵, академик РАН В. В. Ляхович²,
член-корреспондент РАН В. М. Липкин⁴

Поступило 16.12.2019 г.
После доработки 26.12.2019 г.
Принято к публикации 20.01.2020 г.

Исследовали влияние Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF), раково-эмбрионального антигена (РЭА) и поликлональных активаторов (ПА) на продукцию цитокинов клетками крови при раке и незлокачественных заболеваниях молочной железы. Установлено, что влияние эндогенных факторов на продукцию цитокинов клетками крови связано с лимфогенным метастазированием (РЭА: IL-10; HLDF: IL-6, IL-1 β , TNF- α и G-CSF). Особенностью является отсутствие различий между продукцией цитокинов клетками крови у больных раком молочной железы по сравнению с больными незлокачественными заболеваниями с высоким риском злокачественной трансформации, что свидетельствует о схожести функциональной активности клеток крови при этих состояниях. Цитокинпродуцирующий резерв, установленный с помощью ПА, различался при сравнении всех исследуемых групп по уровню TNF- α .

Ключевые слова: HLDF, раково-эмбриональный антиген, поликлональные активаторы, цитокины, рак молочной железы

DOI: 10.31857/S2686738920040058

Известно, что цитокины оказывают влияние на опухолевую прогрессию, однако их биологические эффекты зависят от воздействия на них ряда факторов [1]. На данный момент изучено влияние на продукцию цитокинов клетками крови экзогенных факторов – поликлональных активаторов (ПА), но малоизученным остается влияние эндогенных факторов, к последним относят:

Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF) и раково-эмбриональный антиген (РЭА) [2]. HLDF способен индуцировать дифференцировку клеток HL-60 в фенотипически зрелые гранулоциты [3]. РЭА относится к онкофетальным антигенам и участвует в процессах клеточной адгезии [4]. Не исключено, что изучение продукции цитокинов клетками крови при влиянии на них эндо- и экзогенных факторов, позволит выявить их особенности, как при раке молочной железы (МЖ), так и при незлокачественных заболеваниях (НЗЗ) МЖ с учетом риска их малигнизации [5, 6].

Цель исследования – изучить влияние HLDF, РЭА и ПА на способность клеток крови продуцировать цитокины у больных злокачественными и НЗЗ МЖ.

Материал исследования – периферическая кровь 78 больных инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ) и 35 больных НЗЗ МЖ. Метастазы в лимфатические узлы были обнаружены у 28 больных ИКНТ МЖ. НЗЗ МЖ, согласно литературным данным, были разделены на две группы: 10 больных НЗЗ МЖ с низким риском

¹ ФГБОУ ВО “Новосибирский государственный медицинский университет”, Новосибирск, Россия

² “Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики” – структурное подразделение ФГБНУ ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия

³ АО “Вектор-Бест”, Новосибирск, Россия

⁴ ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” Российской академии наук, Москва, Россия

⁵ ФГБОУ ВО “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”, Новосибирск, Россия

*e-mail: lrciip@211.ru

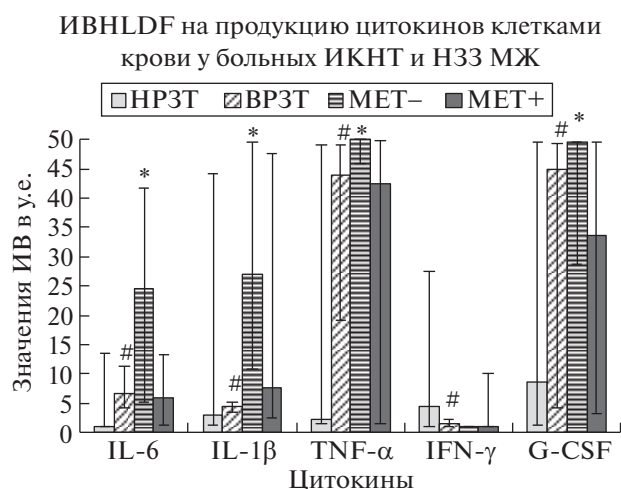


Рис. 1. Индексы влияния фактора дифференцировки HLDF на продукцию цитокинов клетками крови у больных злокачественными и незлокачественными заболеваниями молочной железы. **Примечание:** # – $P = 0.04$ при сравнении IL-6 HP3T и BP3T; $P = 0.01$ при сравнении TNF- α HP3T и BP3T; $P = 0.01$ при сравнении IFN- γ HP3T и BP3T; $P = 0.02$ при сравнении G-CSF HP3T и BP3T. * – $P = 0.02$ при сравнении IL-6 MET- и MET+; $P = 0.03$ при сравнении IL-1 β MET- и MET+; $P = 0.04$ при сравнении TNF- α MET- и MET+; $P = 0.04$ при сравнении G-CSF MET- и MET+.

злокачественной трансформации (HP3T): непролиферативная форма фиброзно-кистозной болезни, фиброаденома; и 15 больных НЗЗ МЖ с высоким риском злокачественной трансформации (BP3T): пролиферативная форма фиброзно-кистозной болезни, склерозирующий аденоз, радиальный рубец, атипичная протоковая гиперплазия [5, 6].

Фактор дифференцировки HLDF [3] и РЭА (carcinoembryonic antigen, human tumor production “Calbiochem”, Германия) использовали в концентрации по 2 мкг/мл. Указанные концентрации подобраны на основании многолетних исследований, проводимых в НИИМББ [7, 8]. Исследование фокусировалось на изучении спонтанной и индуцированной продукцией цитокинов клетками крови в среде DMEM. Компонентами ПА явились: фитогемагглютинин в концентрации 4 мкг/мл, конканавалин А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарид в концентрации 2 мкг/мл, входящие в набор реагентов “Цитокин-стимул-бест”. После отбора из кубитальной вены, кровь вносили по 1 мл во флаконы с соответствующими средами. Флаконы инкубировали в течение суток при 37°C, затем клетки крови осаждали на центрифуге при 900g в течение 15 мин. Концентрации IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 в исследуемых образцах оценивали с помощью иммуноферментных наборов реагентов производства АО “Вектор-Бест”, Новосибирск. Продукцию цитокинов оценивали с помощью индексов влияния (ИВ), выраженных в условных единицах (y.e.): ИВНЛДФ, ИВРЭА, ИВПА, которые высчитывали по формуле А/Б, где А – продукция цитокина после инкубации с HLDF или РЭА, или ПА, а Б – спонтанная продукция цитокина. Статистическая обработка результатов была выполнена с использованием SPSS Statistics 22. Достоверность различий была определена с помощью U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $P < 0.05$. Результаты исследования представлены как медиана и интерквартильный размах.

ИВРЭА на продукцию цитокинов клетками крови у больных ИКНТ и НЗЗ МЖ

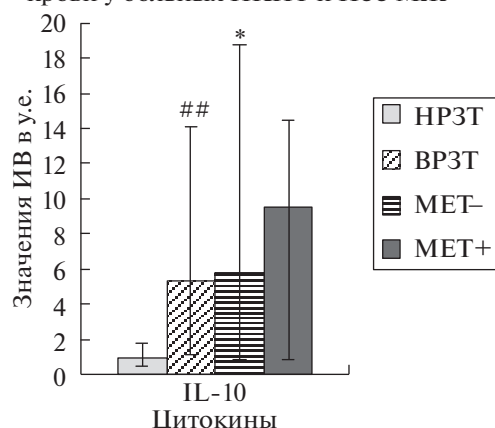


Рис. 2. Индексы влияния раково-эмбрионального антигена (ИВРЭА) на продукцию цитокинов клетками крови у больных злокачественными (ИКНТ) и незлокачественными заболеваниями молочной железы (НЗЗ МЖ). **Примечание:** ## – $p = 0.008$ при сравнении IL-10 HP3T и BP3T. * – $p = 0.04$ при сравнении IL-10 мет- и мет+.

Результаты исследования свидетельствуют об избирательном влиянии HLDF, РЭА и ПА на продукцию цитокинов клетками крови у больных ИКНТ и НЗЗ МЖ (рис. 1–3).

Больные ИКНТ с наличием или отсутствием лимфогенного метастазирования различались по ИВНЛДФ на продукцию IL-6, IL-1 β , TNF- α и G-CSF. Интересным представляется результат, связанный с ИВНЛДФ на продукцию IFN- γ , который, как известно, способствует распознаванию и уничтожению атипичных клеток, и оказывает антипролиферативное действие [9]. Данные свидетельствуют об отсутствии влияния HLDF на продукцию IFN- γ при ИКНТ и НЗЗ с BP3T, которые характеризуются наличием клеточной атипичности и высокой пролиферативной активностью [5]. При сравнении ИКНТ и НЗЗ с BP3T не было

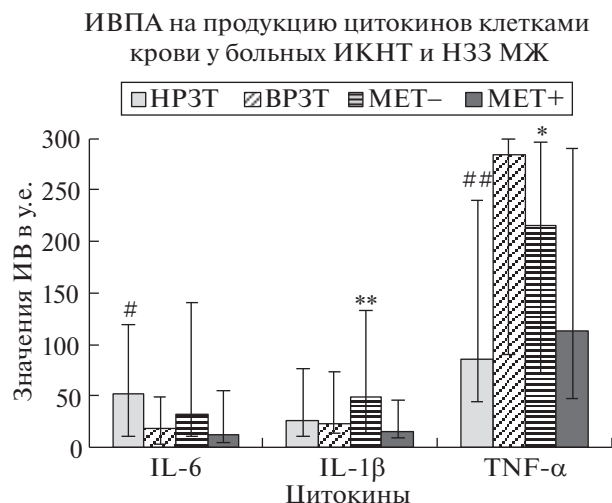


Рис. 3. Индексы влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию цитокинов клетками крови у больных злокачественными (ИКНТ) и незлокачественными заболеваниями молочной железы (НЗЗ МЖ). **Примечание:** # – $P = 0.01$ при сравнении НРЗТ и ВРЗТ IL-6; ## – $P = 0.007$ при сравнении TNF-α НРЗТ и ВРЗТ; * – $P = 0.04$ при сравнении TNF-α МЕТ- и МЕТ+; ** – $P = 0.006$ при сравнении IL-1β МЕТ- и МЕТ+.

получено достоверных различий, в то время как ИКНТ и НЗЗ с НРЗТ различались по ИВНЛДФ на продукцию IL-6 ($P = 0.023$), IL-1β ($P = 0.030$) и IFN-γ ($P = 0.034$).

Влияние РЭА на продукцию IL-10, может быть обусловлено иммуносупрессирующим действием этого цитокина [10]. Наиболее высокий уровень IL-10 отмечался при ИКНТ с лимфогенным метастазированием. При сравнении ИКНТ и НЗЗ с ВРЗТ не было получено достоверных различий, в то время как ИКНТ и НЗЗ с НРЗТ различались по ИВРЭА на продукцию IL-10 ($P = 0.017$).

Использование ИВПА позволяет оценить цитокинпродуцирующий резерв клеток крови. В этом плане наиболее значимым оказался уровень TNF-α, различающийся во всех исследуемых группах, с пиком значений при НЗЗ с ВРЗТ. При сравнении ИКНТ с НЗЗ с ВРЗТ достоверные различия также были получены по ИВПА на продукцию TNF-α ($P = 0.024$), а при сравнении ИКНТ с НЗЗ с НРЗТ различий не было.

Таким образом, влияние эндогенных факторов на продукцию цитокинов клетками крови связано с лимфогенным метастазированием у больных ИКНТ (ИВРЭА: IL-10; ИВНЛДФ: IL-6, IL-1β, TNF-α и G-CSF). Отсутствие различий между продукцией цитокинов клетками крови у больных ИКНТ и больных НЗЗ с ВРЗТ, свидетельствует о схожести функциональной активности клеток крови при этих заболеваниях, которые характеризуются клеточной атипией и высокой

пролиферативной активностью [6]. Цитокинпродуцирующий резерв, установленный с помощью ПА, различался у больных ИКНТ с наличием или отсутствием лимфогенного метастазирования по значениям IL-1β и TNF-α, а при сравнении НЗЗ с НРЗТ и НЗЗ с ВРЗТ по значениям IL-6 и TNF-α. Полученные результаты могут стать основой для разработки дооперационных диагностических методов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Salamat F., Niakan B., Keshtkar A., et al.* Subtypes of Benign Breast Disease as a Risk Factor for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Iran. J. Med. Sci.* 2018. V. 43. № 4. P. 355–364.
2. *Collins D.P.* Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems // *J. Imm. Meth.* 2000. V. 243. № 1–2. P. 125–145.
3. *Костянян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В. и др.* Биологически активный фрагмент фактора дифференцировки клеток линии HL-60. Идентификация и свойства // *Биооргани. химия.* 2000. Т. 26. № 7. С. 505–511.
4. *Liu C.C., Yang H., Zhang R., et al.* Tumour-associated antigens and their anti-cancer applications // *Eur. J. Canc. Care.* 2017. V. 26. № 5. P. 1–2.
5. *Dyrstad S.W., Yan Y., Fowler A.M., et al.* Breast cancer risk associated with benign breast disease: systematic review and meta-analysis // *Breast Cancer Res. Treat.* 2015. V. 149. № 3. P. 569–575.
6. *Bates J.P., Derakhshandeh R., Jones L., et al.* Mechanisms of immune evasion in breast cancer // *BMC Cancer.* 2018. V. 18. № 1. P. 556.
7. *Ауменшлюс А.И., Куниц Т.А., Карпущина К.В. и др.* Влияние раково-эмбрионального антигена на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови у больных с опухолями молочной железы // *Бюлл. Сиб. Мед.* 2018. Т. 17. № 3. С. 5–12.
8. *Autenshlyus A.I., Kunts T.A., Mikhaylova E.S., et al.* Specific effect of the HLDF differentiation factor on the cytokine production potential of immunocompetent blood cells in stomach adenocarcinoma // *Dokl. Biol. Sci.* 2016. V. 469. № 1. P. 199–201.
9. *Esquivel-Velazquez M., Ostoa-Saloma P., Palacios-Arreola M.I., et al.* The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression // *J. Interf. Cyt. Res.* 2015. V. 35. № 1. P. 1–16.
10. *Lee J.H., Lee S.W.* The Roles of Carcinoembryonic Antigen in Liver Metastasis and Therapeutic Approaches // *Gastr. Res. and Prac.* 2017. № 13. P. 1–11.

INFLUENCE OF INTERNAL AND EXTERNAL FACTORS ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY PERIPHERAL BLOOD CELLS IN BREAST CANCER

**A. I. Autenshlyus^{a,b,#}, K. I. Davletova^{a,b}, E. S. Mikhaylova^{a,b}, A. V. Proskura^b,
N. A. Varaksin^c, A. P. Bogachuk^d, S. V. Sidorov^e, Academician of the RAS V. V. Lyakhovich^b,
and Corresponding Member of RAS V. M. Lipkin^d**

^a *Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation*

^b *Institute of Molecular Biology and Biophysics – subdivision of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation*

^c *AO “Vector-Best”, Novosibirsk, Russian Federation*

^d *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^e *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation*

[#]*e-mail: lpciip@211.ru*

The article focuses on the influence of Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF), Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Polyclonal Activators (PA) on cytokine production by peripheral blood cells in breast cancer and benign breast diseases. It was discovered, that the influence of internal factors on the production of cytokines by the peripheral blood cells is connected with lymphatic metastasis (CEA: IL-10; HLDF: IL-6, IL-1 β , TNF- α and G-CSF). One special circumstance was that there were no differences between production of cytokines by peripheral blood cells in patients with breast cancer compared to the patients with benign breast diseases with high-risk of malignant transformation. This is the evidence the functional similarity of peripheral blood cells in patients with these conditions. Cytokines production under the influence of PA was different only in case of TNF- α in all research groups.

Keywords: HLDF, carcinoembryonic antigen, polyclonal activators, cytokines, breast cancer