



Оценка уровней цитокинов в асцитической жидкости при раке яичников на фоне неoadъювантной химиотерапии

О. И. Алешикова¹, И. Б. Антонова¹, Н. А. Бабаева¹, Е. В. Герфанова², В. О. Шендер^{3, 4}, Л. А. Ашрафян²

¹ Российский научный центр рентгенодиагностики, г. Москва

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, г. Москва

³ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, г. Москва

⁴ Институт биоорганической химии имени академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, г. Москва

Цель исследования: определение уровней цитокинов в асцитической жидкости у пациенток с серозным раком яичников (РЯ) III–IV стадии до и после неoadъювантной химиотерапии (НХТ), проводимой на фоне применения препарата индол-3-карбинола (Indole-3-Carbinol, I3C) в сочетании с эпигаллокатехин-3-галлатом (Epigallocatechin gallate, EGCG).

Дизайн: пилотное исследование.

Материалы и методы. Асцитическая жидкость до начала специального лечения была взята у 24 пациенток. Семь из них не смогли завершить участие в исследовании. Причинами стали гранулезоклеточная опухоль (ГКО), вторичное метастатическое поражение яичников, цистаденома яичника, терапевтическая патология (цирроз печени), и у одной женщины забор биологического материала проведен во время оперативного вмешательства, без НХТ. Таким образом, в исследование вошли 17 женщин. Средний возраст составил $59 \pm 3,8$ года. На 1-м этапе комбинированного лечения проводилась НХТ по стандартной схеме: паклитаксел $175 \text{ мг/м}^2 \text{ в/в}$ в 1-й день и карбоплатин (AUC 6) в/в во 2-й день, медиана составила 4 курса (2–8), с интервалом в 21 день. Дополнительно к НХТ все больные, включенные в исследование, на протяжении всего курса лечения получали препарат, содержащий I3C и EGCG, по 2 капсулы 3 раза в сутки. На 2-м этапе всем 17 пациенткам было выполнено хирургическое вмешательство (экстирпация матки с придатками, субтотальная резекция большого сальника).

В асцитической жидкости были определены уровни 17 цитокинов: ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-17, G-CSF, GM-CSF, ИФН- γ , MCP-1 (MCAF), MIP-1, ФНО- α — до и после НХТ.

Результаты. В группе пациенток, завершивших исследование ($n = 17$), после НХТ значительно уменьшилось содержание всех цитокинов ($p \leq 0,05$), особенно выражено снизились уровни ИЛ-6 и ИЛ-8 — с $3799,7 \pm 177,8$ до $619,6 \pm 36,8$ нг/мл и с $116,4 \pm 6,5$ до $52,5 \pm 3,2$ нг/мл соответственно. У пациентки с неблагоприятным прогнозом и плохим ответом на НХТ регистрировались изначально высокие уровни ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, MCP-1 (MCAF). После НХТ отсутствовала положительная динамика в виде снижения концентраций в асците ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17, G-CSF, ИФН- γ , MCP-1 (MCAF), ФНО- α . Отмечено увеличение уровня ИЛ-10. Таким образом, отсутствие уменьшения содержания цитокинов может быть фактором неблагоприятного прогноза.

Среди результатов пациенток, исключенных из основной группы исследования, интерес представляют следующие данные. При цистаденоме яичника регистрировались наименьшие значения ИЛ-6 (113 нг/мл), ИЛ-10 (3,3 нг/мл), ИЛ-1 β (0,6 нг/мл), ИЛ-4 (1,2 нг/мл), G-CSF (1,99 нг/мл), ИФН- γ (15,9 нг/мл), ФНО- α (17,4 нг/мл). У пациентки с ГКО установлены минимальные значения ИЛ-1 β (0,5 нг/мл), ИЛ-4 (0,2 нг/мл), ИЛ-6 (375,4 нг/мл), ИЛ-8 (18,7 нг/мл), ИЛ-10 (3,5 нг/мл), ИФН- γ (7,5 нг/мл); G-CSF не определялся. В асцитической жидкости, полученной интраоперационно у пациентки, которая не получала НХТ, наблюдались высокие уровни ИЛ-1 β (5,1 нг/мл), ИЛ-4 (4,6 нг/мл), ИЛ-6 (9728,7 нг/мл), ИЛ-8 (368,7 нг/мл), G-CSF (12,1 нг/мл), MCP-1 (MCAF) (227,2 нг/мл), ФНО- α (87,9 нг/мл), ИФН- γ (86,3 нг/мл), значительно превышающие концентрации данных цитокинов в группе пациенток, получавших НХТ.

Заключение. Уровни цитокинов в асците при РЯ могут служить своеобразными биомаркерами, необходимыми для своевременной оценки чувствительности опухоли к тому или иному лекарственному препарату и коррекции проводимой терапии.

Ключевые слова: рак яичников, неoadъювантная химиотерапия, цитокины, асцит, химиорезистентность, воспаление.

Assessment of Cytokine Levels in Ascitic Fluid in Patients with Ovarian Cancer Receiving Neoadjuvant Chemotherapy

O. I. Aleshikova¹, I. B. Antonova¹, N. A. Babaeva¹, E. V. Gerfanova², V. O. Shender^{3, 4}, L. A. Ashrafyan²

¹ Russian Scientific Centre for Radiology, Moscow

² Academician V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

³ Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine, Moscow

⁴ Academicians M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow

Study Objective: To determine ascitic fluid levels of cytokines in patients with stage III–IV serous ovarian cancer (OC) before and after neoadjuvant chemotherapy (NCT) given in combination with indole-3-carbinol (I3C) and epigallocatechin gallate (EGCG).

Study Design: This was a pilot study.

Алешикова Ольга Ивановна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории профилактики, ранней диагностики и комбинированного лечения онкологических заболеваний ФГБУ РНЦРР Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86. E-mail: olga.aleshikova@gmail.com

Антонова Ирина Борисовна — д. м. н., заведующая лабораторией профилактики, ранней диагностики и комбинированного лечения онкологических заболеваний ФГБУ РНЦРР Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86. E-mail: iran24@yandex.ru

Ашрафян Лев Андреевич — академик РАН, д. м. н., профессор, заместитель директора, директор Института онкогинекологии и маммологии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: L_ashrafyan@orapina4.ru (Окончание на с. 64.)



Materials and Methods: Ascitic fluid was collected from 24 patients prior to specific therapy. Seven patients were unable to complete the study. The reasons were a granulosa cell tumor (GCT), secondary metastatic lesions in the ovaries, an ovarian cystadenoma, and a medical condition (hepatic cirrhosis); one patient did not receive NCT, and her samples were taken during surgery. Thus, 17 women were enrolled in the study. The average age of the patients was 59 ± 3.8 .

The first step in combination treatment was a standard NCT regimen: paclitaxel 175 mg/m² IV on day 1 and carboplatin (AUC 6) IV on day 2; the median number of courses was 4 (2–8); the courses length was 21 days. In addition to NCT all patients enrolled in the study received a drug containing I3C and EGCG, 2 capsules 3 times a day, for the entire duration of the study. In the second step of treatment, all 17 patients underwent surgery (radical hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy and subtotal resection of the greater omentum).

Ascitic fluid levels of the following 17 cytokines were determined before and after NCT: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , MCP-1 (MCAF), MIP-1, and TNF- α .

Study Results: In the group of patients who completed the study ($n = 17$) post-NCT levels of all cytokines were significantly lower ($p \leq 0.05$), with reduction in IL-6 and IL-8 levels being particularly marked: from $3,799.7 \pm 177.8$ to 619.6 ± 36.8 ng/mL and from 116.4 ± 6.5 to 52.5 ± 3.2 ng/mL, respectively. The patient with an unfavorable prognosis and poor response to NCT demonstrated initially high levels of IL-5, IL-6, IL-10, and MCP-1 (MCAF). After NCT there were no positive changes, i.e. no reduction in the levels of IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17, G-CSF, INF- γ , MCP-1 (MCAF), or TNF- α in the ascitic fluid. Her IL-10 level rose. Thus, no reduction in cytokine levels may be a predictor of an unfavorable prognosis.

In the subgroup of patients withdrawn from the main group, the following data are of interest. Women with ovarian cystadenoma had the lowest levels of IL-6 (113 ng/mL), IL-10 (3.3 ng/mL), IL-1 β (0.6 ng/mL), IL-4 (1.2 ng/mL), G-CSF (1.99 ng/mL), INF- γ (15.9 ng/mL), and TNF- α (17.4 ng/mL). The patient with a granulosa cell tumor had the lowest levels of IL-1 β (0.5 ng/mL), IL-4 (0.2 ng/mL), IL-6 (375.4 ng/mL), IL-8 (18.7 ng/mL), IL-10 (3.5 ng/mL), and INF- γ (7.5 ng/mL); and undetectable levels of G-CSF. The patient who had not undergone NCT had high levels of the following cytokines in her intraoperatively obtained samples of ascites fluid: IL-1 β (5.1 ng/mL), IL-4 (4.6 ng/mL), IL-6 (9,728.7 ng/mL), IL-8 (368.7 ng/mL), G-CSF (12.1 ng/mL), MCP-1 (MCAF) (227.2 ng/mL), TNF- α (87.9 ng/mL), and INF- γ (86.3 ng/mL), which significantly exceeded those in the group of patients who had undergone NCT.

Conclusion: In patients with OC cytokine levels in the ascitic fluid may be considered biomarkers required for a timely assessment of the tumor susceptibility to certain drugs and/or treatment changes.

Keywords: ovarian cancer, neoadjuvant chemotherapy, cytokines, ascites, chemoresistance, inflammation.

Влияние воспаления на онкогенез в настоящее время доказано и хорошо изучено, а хроническому воспалению отводится главенствующая роль в этиологии большого числа предопухолевых и опухолевых заболеваний, в том числе злокачественных новообразований женской репродуктивной системы. Например, риск развития рака шейки матки особенно высок среди носительниц ВПЧ онкогенного типа [1].

Сегодня все чаще обсуждается роль воспаления в канцерогенезе рака яичников (РЯ). Эпидемиологические данные свидетельствуют об увеличении заболеваемости РЯ среди пациенток с «хронической овуляцией» и ее снижении у женщин с длительной ановуляцией в связи с беременностями, родами, лактацией, а также приемом оральных контрацептивов; к факторам снижения риска развития РЯ также относят регулярный прием нестероидных противовоспалительных препаратов [2, 3].

Сочетание воспаления в период овуляции и целого ряда молекулярно-биологических и тканевых перестроек с определенной достоверностью позволяет описать вероятную модель канцерогенеза при спорадическом РЯ [4]. В результате многократных овуляторных травм покровного эпителия яичников формируется очаг хронического асептического воспаления, что стимулирует клетки поверхностного эпителия к постоянной пролиферации, увеличивая вероятность генетических повреждений и накопления эпигенетических модификаций [5, 6]. Источником такой пролиферации становятся опухолевые стволовые клетки (ОСК). При этом дальнейшие события могут развиваться по двум вариантам.

Если покровный эпителий представлен производными Мюллера эпителия, то изначально имеет место относительно локализованный опухолевый процесс в зоне яичников

или малого таза, постепенно распространяющийся по брюшной полости (I вариант). При этом варианте РЯ можно отметить многообразие гистологических типов. Если же покровный эпителий представлен мезотелиальным компонентом, то пролиферативный импульс распространен на весь мезотелий (II вариант). При этом изначально имеет место обширное опухолевое поле [7]. При втором патогенетическом варианте РЯ исходный пролиферативный импульс распространяется на весь мезотелий, способствуя стремительному нарастанию критической массы ОСК, циркуляторным руслом для которых становится не только крово- или лимфоток, но и выпотная жидкость: асцит и плеврит, что является специфической особенностью РЯ.

Наличие асцита у больных РЯ тесно коррелирует с плохим прогнозом заболевания. Перитонеальная жидкость — основной фактор, обеспечивающий специфическую локализацию рецидивов и метастазов при РЯ (преимущественно в области малого таза), а также обширную внутрибрюшную диссеминацию опухолевого процесса [8–10].

После признания фундаментальной роли ОСК в патогенезе РЯ и обнаружения метастатически активных ОСК в асците стало ясно, что именно асцит, являясь уникальной провоспалительной нишей туморогенных и химиорезистентных овариальных ОСК, способствует их обширной внутрибрюшной диссеминации и появлению нечувствительных к стандартной химиотерапии, рецидивных и метастатических форм заболевания [11, 12]. В современном понимании образование опухолевого асцита — это накопление за счет лимфатической обструкции и повышенной сосудистой проницаемости избыточной перитонеальной жидкости, содержащей различные клеточные популяции, центральной из которых является популяция туморогенных ОСК, а также широкий спектр

Бабаева Наталья Александровна — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики, ранней диагностики и комбинированного лечения онкологических заболеваний ФГБУ РНЦРР Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86. E-mail: natbabaeva@yandex.ru
Герфанова Евгения Викторовна — врач акушер-гинеколог Института онкогинекологии и маммологии ФГБУ «НМИЦ АгП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: Evgeniyagerf@gmail.com

Шендер Виктория Олеговна — младший научный сотрудник лаборатории протеомики ФГБУН «ИБХ им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН; инженер-исследователь ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины» ФМБА России. 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10. E-mail: shender_vika@mail.ru
(Окончание. Начало см. на с. 63.)

растворимых провоспалительных факторов, определяющих поведение ОСК в ходе дальнейшего канцерогенеза [13–15]. В асцитической жидкости женщин с рецидивными и химиорезистентными формами РЯ содержание ОСК существенно повышено по сравнению с таковым у первичных пациенток и у больных с химиочувствительными опухолями [16, 17].

Кроме ОСК, в асците больных РЯ обнаружены ассоциированные с опухолью фибробласты, мезенхимальные стромальные клетки и иммунные клетки. Будучи компонентами стромального опухолевого микроокружения, они вступают в процессы ауто-/паракриной коммуникации и реципрокных отношений с растущими опухолевыми очагами, в результате чего индуцируется стромальный провоспалительный ответ, сопровождающийся образованием различных паракринных и аутокринных молекул (факторов роста, цитокинов, хемокинов, матриксных протеаз, иммуносупрессоров), оказывающих потенцирующее действие на канцерогенез [18, 19].

В асцитах больных РЯ экспрессируются в повышенных количествах проангиогенные факторы — ангиогенин, ангиопозитин 2 и фактор роста эндотелия сосудов, онкоген *GRO* (growth related oncogene), молекула межклеточной адгезии ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), ИЛ-6, ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-15, а также целый ряд других сигнальных молекул [20–22].

Для многих из этих соединений доказана прогностическая клиническая значимость. У больных РЯ повышенная концентрация в асците (по сравнению с сывороткой крови) важнейших провоспалительных цитокинов — ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10 — достоверно коррелировала с плохими прогнозом и ответом на стандартную терапию [23, 24].

Другими авторами установлено, что уровень экспрессии ИЛ-8 в овариальных опухолевых клетках коррелировал с их повышенной туморогенностью и образованием асцита, а увеличение содержания ИЛ-8 в асците у больных распространенным РЯ вносит важный вклад в общую проангиогенную активность раковых клеток [25]. Доказано, что ИЛ-6 способен стимулировать опухолевый рост, инвазию, ангиогенез [26], химиорезистентность. Повышенный уровень ИЛ-6 в асците при РЯ коррелирует с уменьшением безрецидивной выживаемости, а у пациенток, отвечавших на стандартную химиотерапию, в асците определялся пониженный уровень ИЛ-6 по сравнению с больными, не имевшими ответа на химиотерапию [27]. Вклад в иммуносупрессивную среду вносит упомянутый нами выше ИЛ-10, подавляющий Т-клеточный иммунный ответ [26].

В настоящее время растет понимание того, что асцит при РЯ является легко доступным и крайне ценным источником опухолевого материала, содержащего широкий спектр растворимых компонентов и клеточных популяций, ответственных за овариальный канцерогенез.

Характеристика и изменение молекулярного и генетического профиля этих факторов в ходе лечения могут рассматриваться как достоверные прогностические маркеры, а также маркеры оценки эффективности (мониторинга) проводимой противоопухолевой терапии [23, 24, 28].

Для терапии больных РЯ применяют традиционные методы лечения рака, такие как хирургия и химиотерапия. Основной мишенью эффективной лекарственной терапии должны стать ОСК, а также всевозможные молекулярные мишени, включая медиаторы воспаления, обеспечивающие различные звенья канцерогенеза [29, 30].

Среди известных противоопухолевых соединений с подобным механизмом воздействия особого внимания заслужива-

ют пищевые индолы – индол-3-карбинол (Indole-3-Carbinol, I3C), его физиологический метаболит 3,3'-дииндолилметан и флавоноид эпигаллокатехин-3-галлат (Epigallocatechin gallate, EGCG) [31–33]. Соединения I3C и EGCG обладают противоопухолевой активностью за счет стабилизации генома, уменьшения эстроген-зависимой (восстановление соотношения 2-OHE/16 α -OHE) и эстроген-независимой пролиферации, стимуляции апоптоза, деметилирования генов-онкосупрессоров, подавления асептического хронического воспаления и неоангиогенеза, управления дифференцировкой ОСК и снижения их химиорезистентности и метастатической активности [20].

Таким образом, для достижения максимального терапевтического эффекта при лечении злокачественных опухолей предлагается использовать ингибиторы ОСК в комплексе со средствами стандартной терапии [20, 34, 35]. В этом случае, помимо эрадикации первичного очага, можно ожидать уменьшения вероятности рецидива, а также роста чувствительности опухоли к средствам традиционной терапии.

Основываясь на вышесказанном, мы посчитали необходимым включить в состав стандартной терапии РЯ препарат I3C в сочетании с EGCG, чтобы посредством его воздействия на основные звенья этиопатогенеза заболевания повысить ее эффективность.

Цель исследования: определение уровней цитокинов в асцитической жидкости у пациенток с серозным РЯ III–IV стадии до и после неоадьювантной химиотерапии (НХТ), проводимой на фоне применения препарата I3C в сочетании с EGCG.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все пациентки проходили обследование и лечение в отделении онкогинекологии ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России в 2015–2016 гг.

Асцитическая жидкость до начала специального лечения была взята у 24 пациенток. Семь из них не смогли завершить участие в исследовании. Причинами стали гранулезоклеточная опухоль (ГКО), вторичное метастатическое поражение яичников, цистаденома яичника, терапевтическая патология (цирроз печени), и у одной женщины забор биологического материала проведен во время оперативного вмешательства, без НХТ. Результаты, полученные у этих пациенток, были рассмотрены за рамками протокола, они представляют научный интерес в качестве группы сравнения.

Таким образом, в исследование вошли 17 женщин. Средний возраст составил 59 \pm 3,8 года. Критериями включения были впервые установленный и морфологически верифицированный серозный РЯ III–IV стадии, асцитный вариант; отсутствие мутации генов *BRCA1* и *BRCA2*, подписанное информированное согласие, общее состояние больной по шкале Eastern Cooperative Oncology Group — 0–2 балла, возраст старше 18 лет, ожидаемая продолжительность жизни — более 6 месяцев.

На 1-м этапе комбинированного лечения проводилась НХТ по стандартной схеме: паклитаксел 175 мг/м² в/в в 1-й день и карбоплатин (AUC 6) в/в во 2-й день, медиана составила 4 курса (2–8), с интервалом в 21 день. Дополнительно к НХТ все больные, включенные в исследование, на протяжении всего курса лечения получали препарат, содержащий I3C и EGCG, по 2 капсулы 3 раза в сутки.

На 2-м этапе всем 17 пациенткам было выполнено хирургическое вмешательство (экстирпация матки с придатками, субтотальная резекция большого сальника).

Забор биологического материала (асцита) осуществлялся двукратно: до начала НХТ путем лапароцентеза и интраоперационно (не ранее чем через 21 день после НХТ, медиана — 28 дней).

Забор асцита производился в стерильные стандартные пробирки объемом 50 мл. Центрифугирование полученного материала проводилось при 1500 об./мин в течение 15 минут при комнатной температуре для сепарации клеточной части. Затем образцы помещали на хранение в специализированную холодильную камеру с температурным режимом -80°C и в последующем транспортировали в специальном контейнере для перевозки биологического материала в лабораторию.

В лаборатории на полученных образцах асцита было проведено цитокиновое профилирование с использованием набора Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad, США). По 50 мкл смеси магнитных микрочастиц вносили в лунки 96-луночного планшета, затем дважды промывали частицы буфером для промывки и вносили по 50 мкл стандарта или образца в соответствующие лунки. Инкубирование проводили при комнатной температуре на орбитальном шейкере 850 об./мин в течение 30 минут. Затем планшеты промывали трижды буфером для промывки и в каждую лунку добавляли по 25 мкл биотинилированных антител. Через 30 мин инкубации при комнатной температуре производили три промывки и вносили по 50 мкл буфера Streptavidin-PE с последующим инкубированием в течение 10 минут. Планшеты были промыты трижды буфером для промывки, после чего микрочастицы ресуспендировали в 125 мкл буфера для анализа. Измерение проводили с помощью прибора Bio-Plex Reader. Были определены уровни 17 цитокинов: ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-17, G-CSF, GM-CSF, ИФН- γ , MCP-1 (MCAF), MIP-1b, ФНО- α — до и после НХТ.

Статистическая обработка полученных результатов проведена на компьютере при помощи программного пакета SPSS Statistics 21.0 for Windows. Из-за небольшой выборки и отличного от нормального распределения в ходе анализа применяли непараметрические методы. По этой же причине в описательном анализе данных, помимо среднего значения, высчитывалась медиана. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения динамики уровней цитокинов в опухолевом асците в ответ на химиотерапию нами было проведено цитокиновое профилирование.

У пациенток в общей группе (n = 24) средняя концентрация ИЛ-1 β в асците до НХТ составила 2–3 (0–5) нг/мл,

ИЛ-4 — 2–3 (0–5) нг/мл, ИЛ-6 — 0–10 000 нг/мл, ИЛ-8 — 0–350 нг/мл, ИЛ-10 — 0–160 нг/мл.

Рис. 1. Динамика уровней цитокинов со средней концентрацией менее 60 нг/мл на фоне неoadъювантной химиотерапии в сочетании с препаратом индол-3-карбинола и эпигаллокатехин-3-галлата. Содержание интерлейкинов (ИЛ) 5, 7, 12 и GM-CSF оказалось ниже детектируемого уровня чувствительности прибора, и сигнал обнаружен не был.

* Отличие от исходного уровня статистически значимо ($p \leq 0,05$)

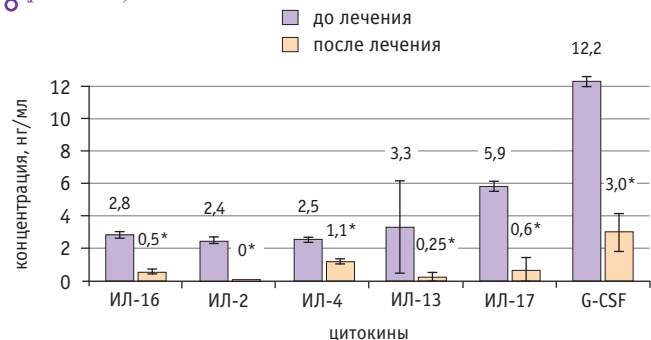


Рис. 2. Динамика уровней цитокинов со средней концентрацией 60 нг/мл и более на фоне неoadъювантной химиотерапии в сочетании с препаратом индол-3-карбинола и эпигаллокатехин-3-галлата.

* Отличие от исходного уровня статистически значимо ($p \leq 0,05$)

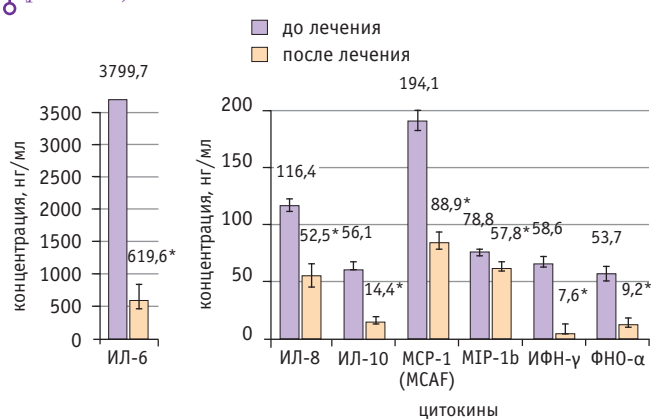


Таблица 1

Динамика уровней цитокинов в асците на фоне неoadъювантной химиотерапии в сочетании с приемом препарата индол-3-карбинола и эпигаллокатехин-3-галлата

Уровни цитокинов, нг/мл	ИЛ-1 β	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-17	G-CSF	ИФН- γ	MIP-1b	ФНО- α
До лечения	2,8 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	3799,7 \pm 177,8	116,4 \pm 6,5	56,1 \pm 1,1	5,9 \pm 0,7	12,2 \pm 1,1	58,6 \pm 3,1	78,8 \pm 1,7	53,7 \pm 1,8
После лечения	0,5 \pm 0,1*	1,1 \pm 0,1*	619,6 \pm 36,8*	52,5 \pm 3,2*	14,4 \pm 1,2*	0,6 \pm 0,2*	3,0 \pm 0,2*	7,6 \pm 2,3*	57,8 \pm 1,8*	9,2 \pm 2,2*

* Отличие от исходного уровня статистически значимо ($p \leq 0,05$).

В группе пациенток, завершивших исследование ($n = 17$), после НХТ значимо уменьшилось содержание всех цитокинов, особенно выражено снизились уровни ИЛ-6 и ИЛ-8 (табл., рис. 1, 2).

В нашем исследовании у пациентки с неблагоприятным прогнозом (низкая степень дифференцировки опухоли, молодой возраст) и плохим ответом на НХТ регистрировались изначально высокие уровни ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, MCP-1 (MCAF). После НХТ отсутствовала положительная динамика в виде снижения концентраций в асците ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17, G-CSF, ИФН- γ , MCP-1 (MCAF), ФНО- α . Отмечено увеличение уровня ИЛ-10. Таким образом, отсутствие уменьшения содержания цитокинов может быть фактором неблагоприятного прогноза.

Среди результатов пациенток, исключенных из основной группы исследования, интерес представляют следующие данные. При цистаденоме яичника регистрировались наименьшие значения ИЛ-6 (113 нг/мл), ИЛ-10 (3,3 нг/мл), ИЛ-1 β (0,6 нг/мл), ИЛ-4 (1,2 нг/мл), G-CSF (1,99 нг/мл), ИФН- γ (15,9 нг/мл), ФНО- α (17,4 нг/мл). У пациентки с ГКО установлены минимальные значения ИЛ-1 β (0,5 нг/мл), ИЛ-4 (0,2 нг/мл), ИЛ-6 (375,4 нг/мл), ИЛ-8 (18,7 нг/мл), ИЛ-10 (3,5 нг/мл), ИФН- γ (7,5 нг/мл); G-CSF не определялся.

В асцитической жидкости, полученной интраоперационно у пациентки, которая не получала НХТ, наблюдались высокие уровни ИЛ-1 β (5,1 нг/мл), ИЛ-4 (4,6 нг/мл), ИЛ-6 (9728,7 нг/мл), ИЛ-8 (368,7 нг/мл), G-CSF (12,1 нг/мл), MCP-1 (MCAF) (227,2 нг/мл), ФНО- α (87,9 нг/мл), ИФН- γ (86,3 нг/мл), значительно превышающие концентрации данных цитокинов в группе пациенток, получавших НХТ, что говорит о необходимости ее проведения у женщин с асцитной формой РЯ.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании определение уровней медиаторов воспаления проводилось дважды — до и после НХТ, что позволило оценить их динамику. До начала НХТ уровни факторов воспаления у всех больных, включенных в наше исследование, были значимо увеличены и превышали те же показатели у пациенток с доброкачественными новообразованиями. На фоне проведенной НХТ в сочетании

с приемом препарата I3C и EGCG в большинстве наблюдений отмечено снижение уровней цитокинов, что позволяет предположить, улучшение прогноза дальнейшего течения и исхода заболевания.

Показано, что асцит — это провоспалительная среда, в которой концентрации биологически активных веществ (цитокинов, хемокинов и факторов роста) способны динамично изменяться, в том числе на фоне НХТ. Они могут быть использованы как биомаркеры, прогнозирующие лекарственную резистентность. Полноценное исследование цитокинов и других молекулярно-биологических факторов позволяет дополнить и обосновать теорию канцерогенеза РЯ.

В данной статье представлены результаты пилотного исследования. Научная работа продолжается, проводится набор пациенток как в основную группу, так и в контрольную. Полученные результаты мы представим в наших следующих публикациях. Но уже на данном этапе становится очевидным, что включение в протокол комбинированного лечения серозного РЯ препаратов, содержащих I3C и EGCG, представляет собой попытку улучшить прогноз заболевания, воздействуя на разные уровни сигнальных каскадов и метаболических путей канцерогенеза.


ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение уровней медиаторов воспаления в асците у больных распространенным серозным раком яичников (РЯ) до и после проведения стандартной неоадьювантной химиотерапии (НХТ), дополненной применением препаратов, содержащих индол-3-карбинол и эпигаллокатехин-3-галлат, безусловно, имеет весомые основания и научный интерес с точки зрения их прогностической значимости и дальнейшего клинического течения заболевания. Уровни цитокинов в асците при РЯ могут служить своеобразными биомаркерами, необходимыми для своевременной оценки чувствительности опухоли к тому или иному лекарственному препарату и коррекции проводимой терапии.

Цитокиновое профилирование выполнено в рамках гранта Российского научного фонда (Проект № 17-75-20205).

ЛИТЕРАТУРА

1. Сухих Г. Т., Прилепская В. Н., ред. Профилактика рака шейки матки: руководство для врачей. М.: МЕДпресс-информ; 2012. 192 с. [Sukhikh G. T., Prilepskaya V. N., red. Profilaktika raka sheiki matki: rukovodstvo dlya vrachei. M.: MEDpress-inform; 2012. 192 s. (in Russian)]
2. Сухих Г. Т., Солодкий В. А., Ашрафян Л. А., Рожкова Н. И. Скрининг и ранняя диагностика гинекологического рака. М.: Молодая гвардия; 2011. 200 с. [Sukhikh G. T., Solodkii V. A., Ashrafyan L. A., Rozhkova N. I. Skrininig i rannaya diagnostika ginekologicheskogo raka. M.: Molodaya gvardiya; 2011. 200 s. (in Russian)]
3. Ашрафян Л. А., Киселев В. И., Муйжнек Е. Л., Алешикова О. И., Герфанова Е. В. Рак яичников: новый взгляд и патогенетические варианты. Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. 2017; 1(15): 35–43. [Ashrafyan L. A., Kiselev V. I., Muizhnek E. L., Aleshikova O. I., Gerfanova E. V. Rak yaichnikov: novyi vzglyad i patogeneticheskie varianty. Akusherstvo i ginekologiya: novosti, mneniya, obuchenie. 2017; 1(15): 35–43. (in Russian)]
4. Ашрафян Л. А. Вероятные патогенетические варианты sporadического рака яичников. Опухоли женской репродуктивной системы. 2012; 3–4: 112–19. [Ashrafyan L. A. Veroyatnye patogeneticheskie varianty sporadicheskogo raka yaichnikov. Opukholi zhenskoi reproduktivnoi sistemy. 2012; 3–4: 112–19. (in Russian)]
5. Kisielowski R., Tołwińska A., Mazurek A., Ludański P. Inflammation and ovarian cancer — current views. Ginekol. Pol. 2013; 84(4): 293–7.
6. Macciò A., Madeddu C. Inflammation and ovarian cancer. Cytokine. 2012; 58(2): 133–47.
7. Ашрафян Л. А., Киселев В. И. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез). М.: Димитрейд График Групп, 2007. 216 с. [Ashrafyan L. A., Kiselev V. I. Opukholi reproduktivnykh organov (etiologiya i patogenez). M.: Dimitreid Grafik Grupp, 2007. 216 s. (in Russian)]
8. Matte I., Lane D., Bachvarov D., Rancourt C., Piché A. Role of malignant ascites on human mesothelial cells and their gene expression profiles. BMC Cancer. 2014; 14: 288.
9. Kipps E., Tan D. S., Kaye S. B. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. Nat. Rev. Cancer. 2013; 13(4): 273–82.
10. Farghaly S. A. Advances in diagnosis and management of ovarian cancer. Springer; 2014. 270 p.
11. Shigdar S., Li Y., Bhattacharya S., O'Connor M., Pu C., Lin J. et al. Inflammation and cancer stem cells. Cancer Lett. 2014; 345(2): 271–8.
12. Ottevanger P. B. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. Semin. Cancer Biol. 2013; 44: 67–71.
13. Zeimet A. G., Reimer D., Sopper S., Boesch M., Martowicz A., Roesler J. et al. Ovarian cancer stem cells. Neoplasma. 2012; 59(6): 747–55.

14. Zhan Q., Wang C., Ngai S. Ovarian cancer stem cells: a new target for cancer therapy. *Biomed. Res. Int.* 2013; 2013: 916819.
15. Lupia M., Cavallaro U. Ovarian cancer stem cells: still an elusive entity? *Mol. Cancer.* 2017; 16(1): 64.
16. Steg A. D., Bevis K. S., Katre A. A., Ziebarth A., Dobbin Z. C., Alvarez R. D. et al. Stem cell pathways contribute to clinical chemoresistance in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18(3): 869–81.
17. Cole J. M., Joseph S., Sudhahar C. G. Enrichment for chemoresistant ovarian cancer stem cells from human cell lines. *J. Vis. Exp.* 2014; 10(91): 51891.
18. Wintzell M., Hjerpe E., Åvall Lundqvist E., Shoshan M. Protein markers of cancer-associated fibroblasts and tumor-initiating cells reveal subpopulations in freshly isolated ovarian cancer ascites. *BMC Cancer.* 2012; 12: 359.
19. Worzfeld T., Finkernagel F., Reinartz S., Konzer A., Adhikary T., Nist A. et al. Proteotranscriptomics reveal signaling networks in the ovarian cancer microenvironment. *Mol. Cell Proteomics.* 2017; PII: mcp.RA117.000400.
20. Ашрафян Л. А., Киселев В. И. Современная онкология, молекулярная биология и перспективы эффективной терапии. М.: Молодая гвардия; 2015. 96 с. [Ashrafyan L. A., Kiselev V. I. *Sovremennaya onkologiya, molekulyarnaya biologiya i perspektivy effektivnoi terapii.* М.: Molodaya gvardiya; 2015. 96 s. (in Russian)]
21. Schauer I. G., Zhang J., Xing Z., Guo X., Mercado-Urbe I., Sood A. K. et al. Interleukin-1beta promotes ovarian tumorigenesis through a p53/NF-kappaB-mediated inflammatory response in stromal fibroblasts. *Neoplasia.* 2014; 15(4): 409–20.
22. Matte I., Lane D., Laplante C., Rancourt C., Piché A. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am. J. Cancer Res.* 2012; 2(5): 566–80.
23. Kolomeyevskaya N., Eng K. H., Khan A. N. H. Cytokine profiling of ascites at primary surgery identifies an interaction of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in predicting reduced progression-free survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2015; 138(2): 352–7.
24. Lane D., Matte I., Garde-Granger P., Laplante C., Carignan A., Rancourt C. et al. Inflammation-regulating factors in ascites as predictive biomarkers of drug resistance and progression-free survival in serous epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer.* 2015; 15: 492.
25. Gawrychowski K., Szewczyk G., Skopińska-Różewska E., Matecki M., Barcz E., Kamiński P. et al. The angiogenic activity of ascites in the course of ovarian cancer as a marker of disease progression. *Dis. Markers.* 2014. 2014: 683757.
26. Jones V. S., Huang R.-Y., Chen L.-P., Chen Zh.-Sh., Fu L., Huang R.-P. Cytokines in cancer drug resistance: cues to new therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1865(2): 255–65.
27. Cohen S., Bruchim I., Graiver D. et al. Platinum-resistance in ovarian cancer cells is mediated by ИЛ-6 secretion via the increased expression of its target cIAP-2. *J. Mol. Med. (Berl.).* 2013; 91(3): 357–68.
28. Kim S., Kim B., Song Y. S. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci.* 2016; 107(9): 1173–8.
29. Bristow R., Armstrong D. *Early Diagnosis and Treatment of Cancer Series: Ovarian Cancer E-Book.* Elsevier Health Sciences; 2015.
30. Ahmed N., Abubaker K., Findlay J., Quinn M. Cancerous ovarian stem cells: obscure targets for therapy but relevant to chemoresistance. *J. Cell Biochem.* 2013; 114(1): 21–34.
31. Киселев В. И., Кузнецов И. Н., Друк В. М., Муйжнек Е. Л. Лекарственная регуляция активности генов. *Вопр. биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2016; 9: 28–35. [Kiselev V. I., Kuznetsov I. N., Drukh V. M., Muizhnek E. L. *Lekarstvennaya regulatsiya aktivnosti genov. Vopr. biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii.* 2016; 9: 28–35. (in Russian)]
32. Bharti A. C., Aggarwal B. B. *Role of nutraceuticals in cancer chemosensitization.* Academic Press; 2017. 398 p.
33. Maruthanila V. L., Poornima J., Mirunalini S. Attenuation of carcinogenesis and the mechanism underlying by the influence of indole-3-carbinol and its metabolite 3,3'-diindolylmethane: a therapeutic marvel. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2014; 2014: 832161.
34. Ашрафян Л. А., Киселев В. И., Муйжнек Е. Л., Герфанова Е. В., Антонова И. Б., Кузнецов И. Н. и др. Современные принципы эффективной терапии рака яичников. *Опухоли женской репродуктивной системы.* 2015; 2: 68–75. [Ashrafyan L. A., Kiselev V. I., Muizhnek E. L., Gerfanova E. V., Antonova I. B., Kuznetsov I. N. i dr. *Sovremennye printsipy effektivnoi terapii raka yaichnikov. Opukholi zhenskoi reproduktivnoi sistemy.* 2015; 2: 68–75. (in Russian)]
35. Ahmed N., Stenvers K. L. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front. Oncol.* 2013; 3: 256. 

Библиографическая ссылка:

Алешикова О. И., Антонова И. Б., Бабаева Н. А., Герфанова Е. В., Шендер В. О., Ашрафян Л. А. Оценка уровней цитокинов в асцитической жидкости при раке яичников на фоне неoadъювантной химиотерапии // Доктор.Ру. 2018. № 2 (146). С. 63–68.

Citation format for this article:

Aleshikova O. I., Antonova I. B., Babaeva N. A., Gerfanova E. V., Shendler V. O., Ashrafyan L. A. Assessment of Cytokine Levels in Ascitic Fluid in Patients with Ovarian Cancer Receiving Neoadjuvant Chemotherapy. *Doctor.Ru.* 2018; 2(146): 63–68.