

Абакумова Т.В., Антонеева И.И., Генинг Т.П., Генинг С.О., Долгова Д.Р., Фомина А.В.

## **Цитокиновый профиль и метаболическая активность нейтрофилов периферической крови при прогрессировании неоплазмы**

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», 432017, Ульяновск, ул.Льва Толстого, 42

Нейтрофил на сегодня рассматривается как своеобразная одноклеточная секреторная железа, реализующая эффекторный потенциал, в том числе и путем секреции растворимых продуктов — цитокинов, матричных металлопротеиназ. Влияние опухоли на функциональную активность нейтрофилов зависит от типа, локализации и стадии ее развития. В нашем исследовании изучена динамика метаболической и фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови, содержания в лизате и сыворотке крови цитокинов IL-1 $\beta$ , 1Ra, 2, 6, 10, 18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и матричных металлопротеиназ-2 и 9 при прогрессировании рака шейки матки. Цитокины и металлопротеиназы определяли иммуноферментным методом, показатели метаболизма — активность миелопероксидазы, щелочной фосфатазы, уровень катионных белков, долю активных клеток в спонтанном НСТ-тесте — цитохимически. Показано, что при прогрессировании рака шейки матки на фоне увеличения общего количества нейтрофилов, имеет место значимое снижение их фагоцитарной активности, аэробной и анаэробной бактерицидности, снижение уровня IL-1 $\beta$  и IL-1 Ra, а также IFN- $\gamma$  при повышении TNF- $\alpha$ , повышение продукции матричной металлопротеиназы-2 на Ib—IIa стадии заболевания, что позволяет предполагать возникновение на этой стадии развития неоплазмы проопухолевого эффекта нейтрофилов.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, рак шейки матки, цитокины, матричные металлопротеиназы

Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Gening T.P., Gening S.O., Dolgova D.R., Fomina A.V.

## **Cytokines profile and metabolic activity of neutrophils of peripheral blood when progressing neoplasma**

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, 42, Leo Tolstoy St., 432017

The neutrophil is considered as the peculiar monocelled sekretorny gland realizing the effector potential including by secretion of soluble products — cytokines and for today. Influence of a tumor on functional activity of neutrophils depends on type, localization and a stage of its development. In our research dynamics of metabolic and of neutrophils of peripheral blood, the contents in a lysate and serums of blood of cytokines of IL-1 $\beta$ , 1Ra, 2, 6, 10, 18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and is studied when progressing a cervical cancer. Cytokines and metabolism indicators — activity of , determined by an immunoferrmental method, level of cationic proteins, a share of active cages in the spontaneous NST-test were cytochemical. It is shown that when progressing cervical cancer against increase in total of neutrophils significant decrease in their , aerobic and anaerobic bacterial action, decrease in the IL-1 $\beta$  and IL-1 Ra level, and also IFN- $\gamma$  takes place at TNF- $\alpha$  increase, increase of production of matrix metalloproteinase-2 on Ib—IIa of a stage of a disease that allows to assume emergence at this stage of cervical cancer of pro-tumoral effect of neutrophils.

**Key words:** neutrophils, cervical cancer, cytokines,

Считается установленным, что нейтрофилы периферической крови (Нф) в организме-опухоленосителе могут играть как про-, так и противоопухолевую роль [1, 2]. Данные литературы и результаты наших исследований [3, 4] позволяют предполагать модифицирующее влияние неоплазмы на фенотип Нф.

Цель исследования — оценка цитокинового профиля и метаболической активности нейтрофилов периферической крови при прогрессировании неоплазмы.

### **Методика**

Обследуемая группа состояла из 87 первичных больных раком шейки матки (РШМ) I—IV стадии (по FIGO). Контрольную группу составили практически здоровые женщины. Для приготовления лизата

Для корреспонденции: Генинг Татьяна Петровна, д. биол.наук., проф., акад. РАЕН, зав. каф. физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, e-mail: Naum-53@yandex.ru

нейтрофилов клетки выделяли из 5 мл гепаринизированной крови на двойном градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho = 1,117$  и  $1,077$  г/мл). Взвесь нейтрофилов трижды отмывали физиологическим раствором. Чистота фракции нейтрофилов составляет 92—94% [5]. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0,5%-ным трипановым синим составляла 95%. Выделенные и отмывые нейтрофилы перемещали по  $50 \pm 5$  тыс. клеток в 0,15 мл физиологического раствора, и путем замораживания/оттаивания из них получали лизаты. Спонтанную продукцию цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-6, IL-10, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , ЗАО «Вектор-Бест-Волга», Н.Новгород) и активных форм матриксных металлопротеиназ (ММП-2,-9, (Quantikine, R&D Systems, USA), ЗАО «БиоХимМак», Москва) определяли твердофазным иммуноферментным методом в лизате Нф и сыворотке крови. Лизаты Нф и сыворотка крови хранилась в течение месяца при  $-25^\circ\text{C}$ . Для оценки фагоцитарной активности Нф рассчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) по Гамбургеру, фагоцитарное число (ФЧ) по Райту и индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ):  $\text{ИЗФ} = \text{ФЧ } 5^\circ / \text{ФЧ } 60^\circ$  [6]. Цитохимически в Нф определяли активность миелопероксидазы (МПО) по методу Грэхема—Кнолля с бензидином [7]; уровень катионных белков (КБ) — по методу М.Г.Шубича с бромфеноловым синим [8], щелочной фосфатазы (ЩФ) методом азосочетания по Rutenburg с соавт. [9], долю активных нейтрофилов (ДАН) в спонтанном варианте с восстановлением нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан [10]. Результаты выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). В каждой мазке подсчитывали 100 или 50 Нф, среди которых определяли процент клеток, содержащих отложения соответствующего фермента и подсчитывали средний цитохимический коэффициент по формуле [11]:

$$\text{СЦК} = \frac{0 \cdot a + 1 \cdot b + 2 \cdot c + 3 \cdot d}{100},$$

где:

$a$  — количество Нф без гранул;

$b, c, d$  — количество Нф с различной степенью окрашивания цитоплазмы.

Цифры указывают на интенсивность окраски цитоплазмы:

0 — отсутствие окраски;

1 — наличие в цитоплазме единичных гранул;

2 — гранулы занимают до 1/3 площади цитоплазмы;

3 — гранулы занимают больше 1/2 площади цитоплазмы.

В качестве центральной характеристики применяли медиану, а при сравнении использовали непараметрический критерий Манна—Уитни.

## Результаты и обсуждение

В ходе исследований установлено значимое увеличение абсолютного и относительного количества Нф (рис. 1).

ФИ у больных РШМ был значимо снижен по сравнению с контролем и составил на Ia стадии  $40,4 \pm 0,4\%$ ; на Ib—IIa стадии  $30,6 \pm 4,4\%$  и  $35,1 \pm 5,9\%$  на IIb—IV стадии против  $70,8 \pm 0,4\%$  в контроле. Также было снижено ФЧ:  $1,54 \pm 0,08$  у.е. на Ia стадии и  $1,46 \pm 0,08$  у.е. на IIb—IV стадии против  $1,97 \pm 0,18$  у.е. в контроле. При этом фагоцитоз идет, возможно, по незавершенному типу, так как ИЗФ на всех клинических стадиях заболевания меньше 1,0.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [1] о зависимости фенотипа Нф от стадии опухолевого процесса. Так, на Ia стадии при незначительном снижении общего количества Нф (рис. 1) резко и значимо снижается их фагоцитарная активность при одновременном нарушении завершенности фагоцитоза, но возрастает ДАН в НСТ-тесте, активность МПО и КФ (рис. 2). При местноразличном процессе (Ib—IIa стадии) абсолютное количество Нф значимо увеличивается, но продолжает снижаться фагоцитарная активность, резко снижена и количества ДАН, не изменяется активность МПО, определяющая аэробную бактерицидность. Остается повышенной активность КФ и значимо снижается уровень КБ — показатель анаэробной бактерицидности. На стадии распространенного процесса (IIb—IV) продолжает увеличиваться абсолютное количество Нф и повышается уровень КБ (рис. 2).

В настоящее время считается доказанной роль Нф в формировании «цитокиновой сети». Они могут секретировать ряд про- и противовоспалительных цитокинов

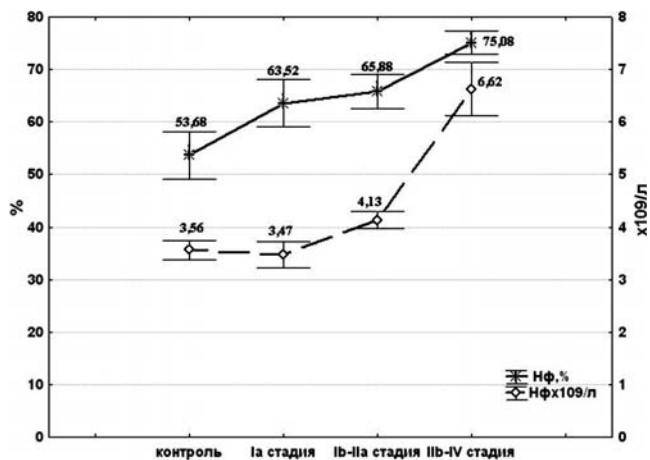


Рис. 1. Абсолютное и относительное количество Нф на различных клинических стадиях РШМ.

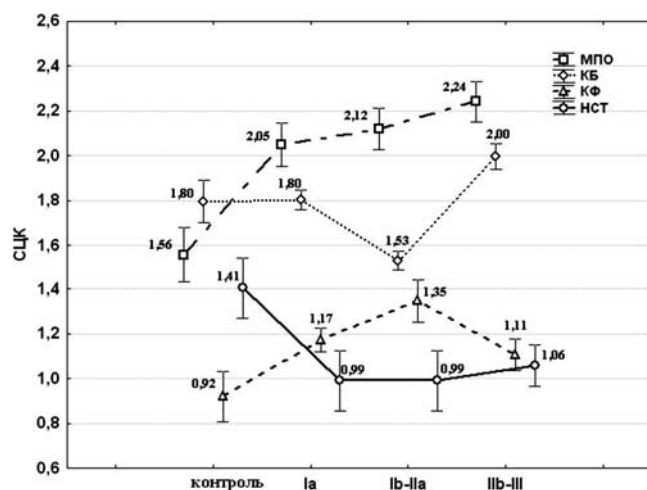


Рис. 2. Показатели метаболической активности периферических Нф при прогрессировании РШМ

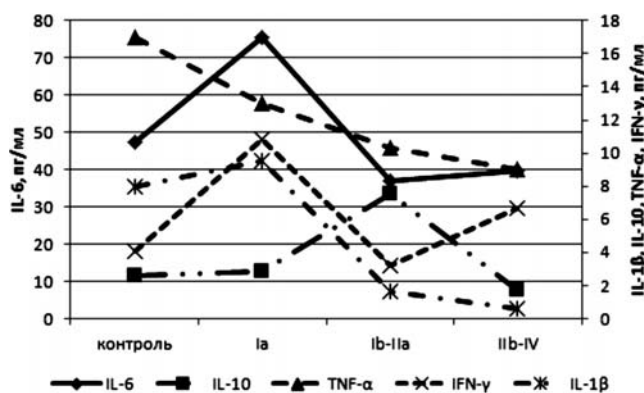


Рис. 3. Уровень цитокинов в сыворотке крови.

[12, 13], отвечать на воздействие цитокинов повышением экспрессии генов, участвующих в реализации фагоцитоза, и рецепторов, присущих антигенпрезентирующим клеткам. В то же время раковые клетки секретируют широкий спектр цитокинов [14]. В экспериментах *in vitro* показано влияние цитокинов, активирующих Нф вследствие воздействия их на сигнальные пути [15]. Су-

ществует мнение, что смена противоопухолевого действия Нф на проопухолевое может быть результатом действия биологически активных веществ, и, в том числе, цитокинов, продуцируемых опухолью [16].

Нами было установлено значимое повышение уровня IL-6 и IFN- $\gamma$ , тенденция к увеличению IL-1 $\beta$  и IL-10 и снижение уровня TNF- $\alpha$  в сыворотке крови на Ia стадии заболевания (рис. 3).

В лизате Нф уровни IL-6, 10 и TNF- $\alpha$  также возрастали, IFN- $\gamma$  был на уровне контроля, и снижались по сравнению с контролем уровни IL-18, IL-1 $\beta$  и IL-1Ra (таблица). Снижение уровня TNF- $\alpha$  коррелирует с падением фагоцитарной активности Нф на стадии Ib—IIa ( $r = 0,3550$ ;  $\rho < 0,02$ ) и на стадии IIb—IV ( $r = 0,5600$ ;  $\rho < 0,02$ ). В то же время ряд экспериментов показывает, что Нф повреждают опухолевые клетки с помощью растворимых медиаторов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ). Определяемые нами уровни TNF- $\alpha$  в лизате Нф были значимо повышены на всех стадиях заболевания (таблица), в то время как уровни IL-1 $\beta$  были снижены, а IFN- $\gamma$  — снижены до 0 на стадии Ib—IIa, либо были на уровне нормы на остальных стадиях (таблица).

IL-1 $\beta$ , продуцируемый Нф, все свои эффекты осуществляет через взаимодействие с рецепторами IL-1Ra. Нами установлено пониженное количество IL-1Ra в лизате Нф больных уже на Ia стадии и значимо снижающееся при прогрессировании заболевания (табл.). При оценке корреляции уровня IL-1 $\beta$  в сыворотке крови с ДАН нами установлены слабые коррелятивные связи на Ib—IIa стадии ( $r = 0,3551$ ;  $\rho < 0,02$ ) и IIb—IV стадии ( $r = 0,3590$ ;  $\rho < 0,02$ ).

ММП-9 играет существенную роль в механизмах опухолевой прогрессии [17]. Существует точка зрения, согласно которой, ММП-9 может тормозить прогрессирование опухолевого процесса, в частности, за счет генерирования ангиогенного ингибитора ангиостатина, тормозящего ангиогенез, рост первичной опухоли и метастазирование [18]. Наблюдаемое нами снижение уровня ММП-9 (рис.4) при РШМ в сыворотке крови и лизате Нф, служащих одним из клеточных источников

Таблица

Уровень цитокинов (пг/мл) в лизате Нф при прогрессировании РШМ

	IL-1 $\beta$	IL-1Ra	IL-2	IL-6	IL-10	IL-18	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
Доноры, n = 30	12,908 (0-42,268)	3000 (3000-3000)	81,329 (32,46-127,41)	1,504 (0,65-3,521)	68,163 (0-139,82)	39,79 (5,378-160,66)	1,5835 (0-5,674)	1,007 (1,66-3,56)
РШМ Ia стадия, n = 24	8,074* (0-15,19)	2831,42 (2325,69-3000)	68,49* (0-97,46)	2,276* (1,33-3,41)	96,93* (15,04-141,95)	24,29* (2,1-137,49)	3,435* (0-7,9)	0,97 (0-6,47)
РШМ Ib—IIa стадия, n = 24	3,739* (0-8,102)	2404,23 (918,225-3000)	49,16* (8,763-91,878)	0,555* (0-1,144)	88,37* (5,44-145,50)	72,26* (6,885-193,66)	4,68* (0-14,39)	0
РШМ IIb—IV стадия, n = 24	4,66* (0,415-10,631)	1702,3* (808,864-3000)	65,78* (58,25-73,306)	0,872 (0-1,575)	93,71* (0-191,15)	93,74* (6,159-369,99)	7,75* (0-21,3)	0,979 (0-6,76)

Примечание. \* — данные статистически значимо отличаются от аналогичных в контрольной группе

ММП-9 [19], позволяет предполагать неэффективность ММП-9 в качестве мишени для противоопухолевой терапии при РШМ. ММП-2 в кровотоке, помимо Нф, может секретироваться циркулирующими опухолевыми клетками и тромбоцитами [20] и, по данным литературы, включена в механизмы опухолевой инвазии [21] и опухолиндуцированного ангиогенеза [22].

Нами установлено существенное и значимое повышение уровня ММП-2 в сыворотке крови при неизменном её уровне в лизате Нф на всех стадиях РШМ (рис. 4).

### Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать у больных при прогрессировании РШМ на фоне увеличения общего количества Нф значимое снижение их фагоцитарной активности, аэробной и анаэробной бактерицидности на Ib—IIa стадии заболевания. На этой же стадии в Нф снижен уровень IL-1 $\beta$  и его рецептора IL-1Ra, а также количество IFN- $\gamma$ . При этом возрастает уровень провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$ . На Ib—IIa стадии РШМ имеет место нарастание уровня TNF- $\alpha$  и IL-18, при одновременном снижении уровня IFN- $\gamma$ , IL-1Ra и IL-2, благоприятный для прогрессирования неоплазмы. Динамика ММП-2 и -9 в сыворотке и лизате Нф не коррелирует со стадией РШМ. Наблюдаемые изменения функционального состояния Нф и цитокинового статуса сыворотки крови позволяют предполагать возможность возникновения проопухолевого эффекта Нф на Ib—IIa стадии РШМ.

*Работа выполнена при поддержке базовой части гос. задания Минобрнауки России*

### Список литературы

1. Mueller M.M., Fusenig N.E. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. 2004; 4(11): 839-49.
2. Клишо Е.В. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы при плоскоклеточном раке головы и шеи: Автореферат дис. д-ра мед. наук. Томск; 2011. 43 с.
3. Klink M., Jastrzebska K., Nowak M. et al. *Scand J Immunol.* 2008; 68(3): 328-36.
4. Антонеева И.И., Генинг Т.П. Нейтрофильные гранулоциты в динамике прогрессии рака яичников. *Клин.лаб.диагностика.* 2007; 8: 43-6.
5. Алборов Р.Г. Роль клеток крови в связи между толерантностью к тромбину, содержанием в кровотоке продуктов взаимодействия тромбин-фибриноген и липидпероксидацией: Автореферат дис. д-ра мед. наук. Тюмень; 2006. 45 с.
6. Коган А.Х. Фагоцитзависимые кислородные — свободнорадикальные механизмы аутоагрессии в патогенезе внутренних болезней. . 1999; 2: (3).

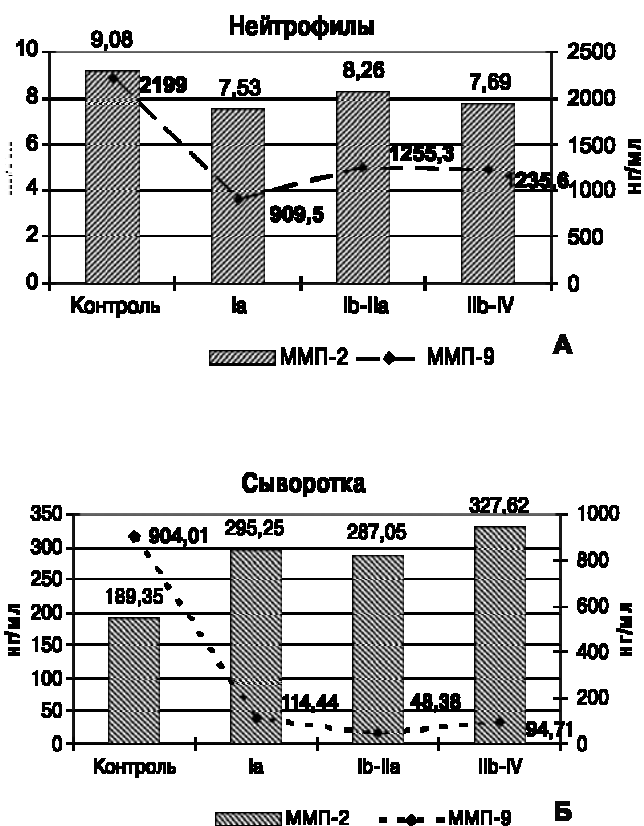


Рис. 4. Изменение уровня матриксных металлопротеиназ в лизате нейтрофилов (А) и сыворотке крови (Б).

7. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург; 2001. 278с.

8. Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего. *Цитология.* 1974; 16(10): 1321-2.

9. Шубич М.Г., Нагоев Б.С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. М.: Медицина; 1980. 224с.

10. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Система интерлекинов и рак. Киев; 2000. 224с.

11. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии (справочник). СПб.: «Интермедика»; 1999; 656с.

12. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Роменская В.А. Нейтрофильные гранулоциты — ключевые клетки иммунной системы. *Аллергология и иммунология.* 2008; 9(4): 432-6.

13. Cassatella M.A., Mosna F., Micheletti A. et al. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells.* 2011; 29(6): 1001-11.

14. Gregory A.D., Houghton A.M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 2011; 71(7): 2411-6.

15. Iking-Konert C., Cseko C., Wagner C. et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med (Berl).* 2001; 79(8): 464-74.

16. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофилов в генезе опухоли. *Цитология*. 2009; 6: 467-74.

17. Ганусевич И.И. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. II. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей. *Онкология*. 2010; 12(2): 108-17.

18. Chen X., Su Y., Fingleton B. et al. Increased plasma MMP9 in integrin alpha1-null mice enhances lung metastasis of colon carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2005; 116(1): 52-61.

19. Acuff H.B., Carter K.J., Fingleton B. et al. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res*. 2006; 66(1): 259-66.

20. Dashevsky O, Varon D, Brill A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. *Int J Cancer*. 2009; 124(8): 1773-7.

21. Zhu X., Mulcahy L.A., Mohammed R.A. et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. 2008; 10(6): 95.

22. Chetty C., Lakka S.S., Bhoopathi P. et al. *Cancer Res*. 2008; 68(12): 4736-45.

## References

1. Mueller M.M., Fusenig N.E. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(11): 839-49.

2. Klisho E.V. Matrix metalproteinase and their fabric inhibitors at a low-grade squamous intraepithelial lesion cancer of the head and a neck: Diss. Tomsk; 2011; 43 p. (in Russian)

3. Klink M., Jastrzebska K., Nowak M. et al. Ovarian cancer cells modulate human blood neutrophils response to activation in vitro. *Scand J Immunol*. 2008; 68(3): 328-36.

4. Antoneeva I.I., Gening T.P. Neutrophilic granulocytes in the time progression of ovarian cancer. *Klin. Lab. Diagnostika*. 2007; 8: 43-6. (in Russian)

5. Alborov R.G. Role of blood cells in communication between tolerance to thrombin, the contents in a blood-groove of products of interaction thrombin-fibrinogen and a lipidperoxidation: Diss. Tyumen; 2006; 45 p. (in Russian)

6. Kogan A.H. Phagocyte's depend the oxygen — free radical mechanisms of an autoaggression in патогенезе internal diseases. *The Messenger of the Russian academy of medical sciences*. 1999; 2: 3. (in Russian)

7. Dolgushin I.I., Bukharin O.V. Neutrophils and homeostasis. *Ekaterinburg*; 2001; 278 p. (in Russian)

8. Shubich M.G. Identification of cationic protein in cytoplasm of leukocytes by means of bromfenolovy blue. *Cytology*. 1974; 16(10): 1321-2. (in Russian)

9. Shubich M.G., Nagoev B.S. Alkaline phosphatase of leukocytes in norm and pathology. M.: Medicine; 1980; 224p. (in Russian)

10. Berezhnaya N.M., Chekhun V.F. Sistema of interleukin and cancer. Kiev; 2000. 224p. (in Ukraine)

11. Karpishchenko A.I. Medical laboratory technologies (reference book). SPb.: «Intermedika»; 1999; 656p. (in Russian)

12. Nesterova I.V., Shvydchenko I.N., Romensky V.A. Neutrophils granulocytes — key cages of immune system. *Allergology and immunology*. 2008; 9(4): 432-6. (in Russian)

13. Cassatella M.A., Mosna F., Micheletti A., et al. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells*. 2011; 29(6): 1001-11.

14. Gregory A.D., Houghton A.M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res*. 2011; 71(7): 2411-2416.

15. Iking-Konert C., Cseko C., Wagner C. et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med (Berl)*. 2001; 79(8): 464-74.

16. Maltseva V.N., Safronov V.G. Ambiguity role of neutrophils in oncogenesis *Cytology*. 2009; 6:467-74. (in Russian)

17. Ganusevich I.I. Role the matriksi metalproteinases (MMP) at malignant new growths. II. MMP participation in angiogenesis, invasions and metastazirovaniya of tumors. *Oncology*. 2010;12(2): 108-17. (in Russian)

18. Chen X., Su Y., Fingleton B. et al. *Int J Cancer*. 2005; 116(1): 52-61.

19. Acuff H.B., Carter K.J., Fingleton B. et al. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res*. 2006; 66(1): 259-66.

20. Dashevsky O, Varon D, Brill A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. *Int J Cancer*. 2009; 124(8): 1773-7.

21. Zhu X., Mulcahy L.A., Mohammed R.A. et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. 2008; 10(6): 95.

22. Chetty C., Lakka S.S., Bhoopathi P. et al. *Cancer Res*. 2008; 68(12): 4736-45.

Поступила 11.11.14

Received 11.11.14

## Сведения об авторах:

Абакумова Татьяна Владимировна — канд. биол. наук, доцент каф. физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, e-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Антонеева Инна Ивановна — доктор мед. наук, проф. каф. онкологии и лучевой диагностики Ульяновского государственного университета, e-mail: aii72@mail.ru

Генинг Снежанна Олеговна — клинический ординатор по специальности «Онкология» Ульяновского государственного университета, e-mail: Naum-53@yandex.ru

Долгова Динара Ришатовна — канд. биол. наук, доцент каф. физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, e-mail: dolgova.dinara@yandex.ru

Фомина Анастасия Владимировна — канд. биол. наук, инженер-исследователь Научно-исследовательского медико-биологического центра Ульяновского государственного университета, e-mail: saylorxmoon@mail.ru