

Т. П. Якімова,
С.М. Карташов,
Т.В. Скрицька

Інститут медичної радіології
ім. С.П. Григор'єва
АМН України,
Харків,
Харківська медична академія
післядипломної освіти

Фактор некрозу пухлин, апоптоз і клініко- морфологічна характеристика раку яєчників

Tumor necrosis factor, apoptosis and clinical
morphology of ovarian cancer

Цель работы: Выявление взаимосвязей между динамикой апоптоза, фактором некроза опухолей (ФНО- α) и прогрессией рака яичников (РЯ).

Материалы и методы: У 130 больных, 25 из которых имели серозную цистоаденому яичника, а остальные 105 — РЯ II–IV стадии (T2a–3cN0–1M0–1), изучено содержание ФНО- α в крови и апоптотный индекс (АИ) в опухоли. Определяли ФНО- α иммуноферментным методом в сыворотке крови. С использованием флуоресцентного микроскопа подсчитывали количество клеток с характерной для апоптоза морфологией (ядерная конденсация и ДНК-деградация). Результат выражали в процентном содержании клеток, имеющих признаки апоптоза, из 100 исследованных, что соответствовало АИ.

Результаты: Активность апоптоза резко возрастает по мере малигнизации серозных опухолей и распространенности процесса до III стадии. При выходе опухолевого процесса за пределы брюшной полости активность апоптоза угнетается, как и при появлении жидкостей в серозных полостях. Концентрация ФНО- α в крови больных РЯ неуклонно и достоверно увеличивается при малигнизации серозных доброкачественных опухолей, вместе с распространением заболевания и нарастанием опухолевой массы. Прорастание РЯ за пределы малого таза и брюшной полости с появлением асцита и плеврита сопровождается увеличением содержания цитокина — ФНО- α в крови по сравнению с его уровнем у больных с безасцитной формой. При нарастании массы опухолевой ткани при переходе от кистозной к кистозно-солидной и солидной формам РЯ происходит увеличение содержания цитокина в крови, что может свидетельствовать об участии ФНО- α в прогрессии РЯ.

Выводы: Апоптоз играет незначительную роль в регрессии и инволюции опухоли, в том числе индуцируемой химиотерапией. Значительная роль в опухолевом процессе принадлежит ФНО- α , и более выраженная — в прогрессии, чем в регрессии новообразования.

Ключевые слова: рак яичников, морфология, фактор некроза опухоли, апоптотный индекс.

Objective: To reveal the association between the dynamics of apoptosis, tumor necrosis factor (TNF- α) and progress of ovarian cancer (OC).

Material and Methods: Blood TNF- α and apoptosis index (AI) were investigated in 130 patients, of them 25 with serous cystadenoma of the ovary, the rest 105 with stage II-IV OC (T2a-3cN0-1M0-1). Blood serum TNF- α was determined using an immunoenzyme method. The number of the cells with characteristic apoptosis morphology (nuclear condensation and DNA degradation) was calculated using a fluorescent microscope. The finding was expressed as percentage the cells (of 100 investigated) with the signs of apoptosis, which corresponded to AI.

Results: Apoptosis activity increased with malignization of serous tumors and dissemination of the process up to stage III. When the tumor process exited the abdominal cavity and fluid accumulated in the serous cavities, this inhibited apoptosis activity. Blood TNF- α concentration in patients with OC increased constantly and significantly with malignization of serous benign tumors together with the disease dissemination and increase of the tumor mass. Generalization of OC outside the small pelvis and abdominal cavity with ascites and pleurisy development was accompanied by increase in the cytokine (TNF- α) concentration when compared with the respective concentration in patients without ascites. Increase in the tumor tissue mass on transition from cystic to cystic-solid and solid OC was accompanied by increase in blood cytokine amount, which could suggest TNF- α participation in OC progress.

Conclusion: Apoptosis plays an insignificant role in the tumor regression and involution including those induced by chemotherapy. A considerable role in the tumor process is played by TNF- α , more pronounced at progress than at regression of the tumor.

Key words: ovarian cancer, morphology, tumor necrosis factor, apoptosis index.

Поява, ріст і розвиток пухлин відбуваються в організмі людини з багатьма чинниками, які протидіють чи сприяють їх прогресії [1, 2]. Дані щодо участі імунної системи в розвитку та зростанні новоутворів досить суперечливі, оскільки свідчать чи то про пригнічення, чи дефектність імунологічного контролю, або про «вислизання» пухлин з-під контролю імунної системи [3, 4]. Найпершою ланкою в реалізації останнього можна назвати антиген-представля-

ючі клітини системи мононуклеарних фагоцитів — гістіоцити, моноцити та макрофаги, що виділяють монокіни [4, 5]. Одним з таких важливих монокінів є фактор некрозу пухлин α (ФНП- α). Автори [5] вважають, що саме він спричиняє деструкцію, внаслідок якої розвивається апоптоз, або настає загибель клітин-мішеней. Водночас є відомості стосовно пригнічення апоптозу при експресії чинників, що стимулюють ріст пухлини [6–8]. Література

надає відомості й про те, що поряд з пригніченням новоутворів макрофаги можуть сприяти їх прогресії [9]. Такі дані в літературі нечисленні, а при захворюваннях на рак яєчників (РЯ) подібні дослідження практично невідомі.

Метою роботи стало з'ясування взаємозв'язків між динамікою апоптозу й ФНП- α та їх ролі у прогресії РЯ.

Методика дослідження

Дослідження проведено у 130 хворих, з яких у 25 виявлено доброякісну пухлину — серозну цистоаденому яєчника, а в 105 — РЯ II–IV стадії (T2a-3cN0-1M0-1).

У сироватці крові радіоімунологічним методом з використанням набору реагентів ProCon TNF виробництва ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург) визначали ФНП- α . За допомогою люмінесцентного мікроскопа після забарвлення мазків з пухлинними клітинами барвником Hoechst 33342 підраховували кількість клітин із характерною для апоптозу морфологією (ядерна конденсація, деградація ДНК, фрагментоз клітин з мембранною оболонкою). Результат виражали у відсотковому вмісті серед 100 досліджуваних клітин тих, які мали ознаки апоптозу, що відповідало апоптозному індексу AI [7].

Результати та їх обговорення

Результати дослідження вмісту в крові ФНП- α й AI при цистоаденомі та на різних стадіях РЯ подані в табл. 1.

Судячи з поданих у табл. 1 даних, вміст ФНП- α у крові хворих на РЯ вірогідно вищий, ніж при доброякісних пухлинах. До того ж, у крові таких пацієнтів він підвищується в міру збільшення ступеня поширеності хвороби, особливо при III та IV стадії РЯ, коли пухлина розростається за межі черевної порожнини, як метастатичний асцит та плеврит. Відомо, що великі пухлини мають осередки некрозу, що може зумовлюватися недосконалим ангиогенезом та порушенням трофіки, або цьому може сприяти збільшення вмісту фактора некрозу

пухлини. Втім, якщо порівнювати вміст у крові хворих ФНП- α з поширенням РЯ за межі малого таза і наявністю асцити $24,40 \pm 1,91$ пкг/мл та полісерозиту у вигляді асцити і плевриту — $26,10 \pm 1,95$ пкг/мл ($p < 0,05$), із безасцитними формами — $20,30 \pm 1,77$ пкг/мл, вірогідні результати виявляються лише при наявності полісерозиту та безасцитних форм РЯ.

Отже, має значення не тільки наявність і поширеність метастазів, але й інші фактори, зокрема об'єм первинної пухлинної тканини. Це підтверджують рівні вмісту ФНП- α при кістозній ($16,70 \pm 1,95$ пкг/мл), і кістозно-солідній ($23,90 \pm 1,37$ пкг/мл, $p < 0,01$) та солідній формах пухлин ($26,40 \pm 1,97$ пкг/мл, $p < 0,01$). Зменшення кістозного й збільшення солідного компонентів пухлини пов'язане зі зростанням об'єму пухлинної маси і підвищенням ступеня злоякісності та зниженням ступеня диференціювання пухлини.

Дослідження апоптозу при малігнізації серозних доброякісних кіст та в міру підвищення ступеня поширеності РЯ показали, що AI при РЯ збільшується порівняно з його величиною при серозних кістах при II стадії в 4 рази, при III — у 5. При IV стадії, хоча значення AI і збільшене у понад 4 рази, але воно нижче, ніж при III стадії. Тобто направленість динаміки вмісту ФНП- α у крові хворих на РЯ та AI залежно від стадії захворювання має спільну тенденцію тільки до III стадії. За більшої поширеності РЯ апоптоз не має вирішального значення в регресії пухлин, такий висновок підтверджує динаміка змін величини AI, коли рак виходить за межі малого таза та розвиваються серозити. Величина AI при безасцитній формі хвороби ($1,15 \pm 0,08$ %) і за наявності полісерозиту — асцити та плевриту ($1,14 \pm 0,07$ %)

Таблиця 1

Вміст ФНП- α в крові хворих та апоптозний індекс у клітинах пухлин при раку яєчників різних стадій
TNF- α amount in the blood of the patients and apoptosis index in the tumor cells at various stages of ovarian cancer

Хворі		ФНП- α , пкг/мл	AI, %
група	кількість		
1 — цистоаденома яєчника	25	$13,40 \pm 1,20$	$0,25 \pm 0,03$
2 — рак яєчника II ст.	23	$18,90 \pm 1,82$ *1	$1,07 \pm 0,10$ **1
3 — рак яєчника III ст.	47	$24,30 \pm 1,49$ *2 **1	$1,23 \pm 0,08$ **1
4 — рак яєчника IV ст.	35	$26,10 \pm 1,95$ *2 **1	$1,14 \pm 0,07$ **1

Примітка. Тут і далі: відмінності між групами вірогідні: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

практично однакова. За наявності однієї асцитної форми РЯ АІ вищий ($1,20 \pm 0,09 \%$), ніж при безасцитній та полісерозитній формах, але це збільшення не вірогідне й підтверджує, що АІ підвищується тільки до III стадії РЯ. Таким чином, феномен апоптозу відіграє незначну роль у регресії пухлини при РЯ і практично пригнічується при значній поширеності процесу, і ця динаміка різнонаправлена з динамікою ФНП- α , який із розповсюдженням процесу поступово тільки зростає.

Зміни величини АІ при збільшенні об'єму пухлинної маси за перетворення РЯ з кістозної на кістозно-солідну й солідну форми також свідчать про відсутність збігу направленості динаміки ФНП- α та АІ. Апоптозний індекс за кістозної форми РЯ, коли пухлинна маса невелика, найменший — $0,95 \pm 0,11 \%$. При збільшенні маси пухлини і формуванні кістозно-солідних пухлин АІ вірогідно зріс порівняно з попереднім показником до $1,21 \pm 0,06 \%$ ($p < 0,05$). Коли РЯ має солідну форму, АІ знижується до $1,09 \pm 0,07 \%$, тобто близько до величини, виявленої при кістозних формах.

Доказом правильності наших висновків про те, що при поширених формах РЯ високі концентрації ФНП- α можуть справляти не протипухлинну дію, а стимулювати ріст новоутвору, є його рівні за різних ступенів вираженості й об'ємів некрозу на різних стадіях захворювання (табл. 2).

Як видно з результатів, поданих у табл. 2, концентрація ФНП- α у крові не підвищується синхронно зростанню ступеня вираженості некрозів у пухлині. При III та IV стадіях захворювання ми спостерігаємо збільшення концентрації цитокіну у крові тільки при підвищенні ступеня вираженості некрозів від слабо до помірно вираженого, але синхронне зростання показника ФНП- α пов'язане лише зі збільшенням стадії хвороби. Втім, цієї тенденції ми не виявили при наявності значних об'ємів некрозів.

Якщо порівняти продемонстровану динаміку вмісту ФНП- α та апоптозу на різних стадіях процесу, то можна зазначити, що її направленість зберігається до III стадії захворювання, після чого АІ знижується, а зростання рівня ФНП- α триває. Водночас динаміка вмісту цитокіну та АІ має однакову направленість з урахуванням таких генетично детермінованих факторів канцерогенезу, як спадкова схильність до раку і первинне безпліддя, яке розглядають як фактор ризику розвитку [10–12] новоутворів.

Як свідчать результати дослідження вмісту ФНП- α у крові хворих та АІ у пухлинах жінок із безпліддям і спадковою схильністю до раку, обидва показники мають тенденцію до зниження порівняно з їх величинами у хворих зі збереженою репродуктивною функцією та без спадкової схильності до раку (табл. 3). Ці дані

Таблиця 2

Вміст ФНП- α у крові на різних стадіях раку яєчників та ступінь вираженості некрозів у пухлинах
TNF- α amount in the blood at various stages of ovarian cancer and the degree of necrosis in the tumor

Стадія захворювання	Вміст ФНП- α у крові, пкг/мл, залежно від об'єму некрозу		
	незначний — об'єм до 25 %	помірно виражений — до 50 %	значний — до 75 %
II	$17,9 \pm 2,0$, n = 12	$17,6 \pm 2,5$, n = 5	$22,1 \pm 3,6$, n = 6
III	$22,7 \pm 2,4$, n = 11	$24,9 \pm 2,3$ *II стадія, n = 18	$24,7 \pm 2,1$, n = 18
IV	$24,3 \pm 3,5$, n = 5	$27,7 \pm 2,9$ **II стадія, n = 16	$24,9 \pm 2,7$, n = 14

Таблиця 3

Вміст ФНП- α та апоптозного індексу у хворих із різною репродуктивною функцією та спадковою схильністю до раку
TNF- α amount and apoptosis index in patients with various reproductive function and inherited predisposition to cancer

Досліджувана група		Вміст ФНП- α , пкг/мл	АІ, %
Репродуктивна функція, n = 105	Хворі, що народжували, n = 85	$24,10 \pm 1,22$	$1,15 \pm 0,05$
	Хворі з безпліддям, n = 20	$21,90 \pm 2,21$	$1,11 \pm 0,12$
Спадкова схильність до раку, n = 105	Виявлена, n = 22	$20,30 \pm 1,98$	$1,09 \pm 0,11$
	Відсутня, n = 83	$24,60 \pm 1,25$	$1,15 \pm 0,05$

можуть свідчити про генетично детерміновану знижену здатність пухлин до апоптозу та зменшення активності гістіоцитарної системи у протипухлинному захисті.

Оскільки РЯ виникає у гормонально продукуєчому та гормонозалежному органі, а апоптоз бере участь у процесах гормонально зумовленої інволюції органів, і менопауза супроводжується зниженням імунореактивності організму та інволюцією органів і систем, ми розглянули рівні ФНП- α у крові та АІ у тканині пухлини залежно від віку і репродуктивної активності хворих. Дослідженням встановлено, що ФНП- α не залежить від віку пацієнтки при РЯ, і в репродуктивному віці та клімактеричному періоді дорівнює $24,60 \pm 1,76$ та $24,80 \pm 2,53$ пкг/мл відповідно, а в менопаузі — $22,60 \pm 1,75$ пкг/мл. Разом з тим ми з'ясували, що динаміка АІ у пухлинах залежить від віку. Найменший рівень АІ виявлено в новоутворах хворих на РЯ репродуктивного віку ($0,97 \pm 0,07$ %). У клімактеричному періоді величина АІ вірогідно вище ($1,28 \pm 0,13$ %), ніж у репродуктивному ($p < 0,05$). У менопаузі АІ залишається значно вищим ($1,20 \pm 0,07$ %), ніж у репродуктивному віці, хоча дещо знижується порівняно з показником у клімактеричному періоді. Цю обставину можна трактувати як деяке послаблення генетично запрограмованого апоптозу в менопаузі, як і всіх життєвих процесів у організмі. Даний феномен можна також розглядати як зв'язок між активністю апоптозу в пухлинах і на рівні усього організму.

Наявність високої концентрації ФНП- α у крові хворих на РЯ в усіх зазначених вікових періодах свідчить про те, що система мононуклеарних фагоцитів функціонує незалежно від віку і гормональної активності яєчників, а рівень ФНП- α у крові залежить виключно від ступеня поширеності пухлинного процесу і маси пухлинних клітин, тоді як напруженість апоптозу в пухлині при РЯ пов'язана з активністю яєчників або, можливо, інших тропних гормонів, поширеністю ракового процесу, масою пухлини та інше.

Першим етапом комплексного лікування РЯ може бути операція або хемотерапія, залежно від стадії захворювання та можливості хірургічного лікування. Коли необхідно перевести неопера-

бельні форми в резектабельні у передопераційному періоді частіше проводять від 1 до 3 курсів хемотерапії, яка стимулює регресію пухлини передусім шляхом дистрофії й некротичних змін та усуває, за їх наявності, серозити. Наші дослідження вмісту ФНП- α у крові хворих, що отримали на першому етапі хемотерапію, виявили високу його концентрацію ($25,40 \pm 1,89$ пкг/мл), яка майже не відрізняється від виявленої також у хворих, яким таке лікування не призначили — $24,80 \pm 1,47$ пкг/мл. Величина АІ у пухлинах пацієнтів, що зазнали хемотерапевтичної дії, та інтактних хворих також була практично однаковою ($1,18 \pm 0,09$ % і $1,20 \pm 0,08$ % відповідно). Отже концентрація в крові ФНП- α , що синтезується системою мононуклеарних фагоцитів, куди відносять і гістіоцити, та генетично запрограмований апоптоз не пов'язані з наявністю та об'ємом некрозів пухлини, індукованими хемопрепаратами. Водночас вміст ФНП- α у крові певною мірою залежить від кількості курсів хемотерапії. Так, після першого курсу лікування вміст ФНП- α у крові дорівнює $22,00 \pm 3,52$ пкг/мл, після двох курсів — $25,00 \pm 3,81$ пкг/мл, а після трьох — $26,80 \pm 5,40$ пкг/мл. Ця динаміка вмісту ФНП- α при різній кількості курсів хемотерапії не має вірогідної різниці, але існує чітка тенденція до збільшення концентрації цитокіну після третього курсу хемотерапії. Величина АІ після першого і другого її курсів однакова — $1,13 \pm 0,23$ та $1,14 \pm 0,19$ % відповідно, а після третього курсу підвищується до $1,30 \pm 0,28$ % ($p < 0,05$). Таким чином, ФНП- α не бере значної участі в розвитку та виникненні некротичних процесів при інволюції РЯ під впливом хемотерапії.

Отримані нами результати виявили однонаправлену динаміку вмісту ФНП- α у крові хворих на РЯ та АІ у пухлинах з тенденцією до збільшення після третього курсу хемотерапії, що може бути пов'язано із незначною активацією системи мононуклеарних фагоцитів при посиленій терапевтично зумовленій регресії пухлини або зі зменшенням пухлинної маси. Усі ці висновки свідчать про необхідність подальших досліджень для уточнення патогенезу некротичних, регресивних та проліферативних процесів при РЯ.

Висновки

1. Концентрація ФНП- α у крові хворих неухильно та вірогідно збільшується при малігнізації серозних доброякісних пухлин і поширеності РЯ та зростанні пухлинної маси.

2. Поширення РЯ за межі малого таза й черевної порожнини з виникненням асцити, плевриту та полісерозиту супроводжується збільшенням вмісту цитокіну — ФНП- α у крові порівняно з безасцитною формою.

3. Зростання маси пухлинної тканини при переході від кістозної до кістозно-солідної та солідної форм РЯ супроводжується збільшенням вмісту цитокіну в крові, що може свідчити про участь ФНП- α у цьому процесі на певному періоді прогресії РЯ.

4. Активність апоптозу різко зростає при малігнізації серозних пухлин і поширеності РЯ до III стадії. При виході пухлинного процесу за межі черевної порожнини активність апоптозу пригнічується, зокрема й при появі рідини в серозних порожнинах.

5. Синхронне збільшення концентрації ФНП- α у крові та АІ у пухлинах триває до III стадії захворювання. При IV стадії РЯ концентрація цитокіну у крові продовжує збільшуватися, а АІ — знижується.

6. Апоптоз, як і ФНП- α , відіграє незначну роль у терапевтично зумовленій регресії та інволюції пухлини, що індукується хемотерапією. Найвірогідніше, що ФНП- α у прогресії набуває більшого значення, ніж у регресії РЯ.

Література

1. Урманчева А.Ф., Мешкова И.Е. // *Практ. онкол.* — 2000. — №4. — С. 7–13.
2. Абраменко И.В., Фильченков А.А. // *Вопр. онкол.* — 2003. — Т. 49, №1. — С. 21–30.
3. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. *Система интерлейкинов и рак.* — К.: ДИА, 2000. — 224 с.
4. Chen L. // *Curr. Opin. Immunol.* — 1999. — Vol. 11, № 2. — P. 219–222.
5. Lakour S., Hammann A., Wotawa A. et al. // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61. — P. 1645–1651.
6. Soini Y., Paakko P., Lehto V. P. et al. // *Amer. J. Pathol.* — 1998. — Vol. 153. — P. 1041–1053.
7. Yamasaki F., Tokunaga O., Sugimori H. // *Gynecol. Oncol.* — 1997. — Vol. 66, № 3. — P. 439–448.
8. McCluskey Li., Dubeau L. // *Cur. Opin. in Oncol.* — 1997. — № 9. — P. 465–470.
9. Burke H.B., Henson D.E. // *CME J. Gynecol. Oncol.* — 2002. — № 3. — P. 221–227.
10. Бохман Я.В. *Руководство по онкогинекологии.* — Л.: Медицина, 1989. — 464 с.
11. Barber H., Karmaf N. // *Gynecol. Oncol.* — 2003. — № 65. — P. 127–141.
12. Fox H., Wells M. // *CME J. Gynecol. Oncol.* — 1999. — Vol. 4, №2. — P. 142–150.

Надходження до редакції 14.06.2006.

Прийнято 15.09.2006.

Адреса для листування:
Якимова Тамара Петрівна,
ІМР ім. С.П. Григор'єва АМНУ,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна