

Н.А. Володько
М.І. Ломницька
Ю.Б. Черних
В.А. Барилка

Львівський національний
медичний університет
ім. Данила Галицького,
Львів, Україна

Ключові слова: рак яєчника,
лікарська резистентність,
цисплатин, пухлинне
мікрооточення, ФНП,
ТФР-β, p53.

ЕКСПРЕСІЯ ФНП, ТФР-β ТА p53 У КЛІТИНАХ КЛІНІЧНО ЧУТЛИВОГО ТА РЕЗИСТЕНТНОГО ДО ДІЇ ЦИСПЛАТИНУ РАКУ ЯЄЧНИКА

Резюме. Досліджено зв'язок між рівнями експресії фактора некрозу пухлин (ФНП), трансформуючого фактор росту (ТФР)-β та p53 у зразках раку яєчника (РЯ) та клінічною відповіддю пухлини на хіміотерапію (ХТ) цисплатином. У позитивному середовищі первинних культур клінічно резистентного до ХТ РЯ, виявлено вірогідно вищі рівні ФНП — $0,79 \pm 0,13$ нг/мл порівняно із середовищем культур пухлин, чутливих до ХТ — $0,35 \pm 0,08$ нг/мл ($p < 0,05$). Експресія ТФР-β була вищою в групі чутливих до ХТ пухлин — $4,60 \pm 1,20$ нг/мл та знижувалась у групі резистентних пухлин — $3,76 \pm 0,90$ нг/мл. Рівень експресії ФНП в РЯ після проведення 3 циклів неoad'ювантної ХТ був вищим ($0,54 \pm 0,12$ нг/мл), ніж у хворих, лікування яких починалось із оперативного втручання ($0,31 \pm 0,08$ нг/мл). У зразках первинно оперованих РЯ рівень ТФР-β становив $5,45 \pm 0,91$ нг/мл, а після ХТ і операції — $3,72 \pm 1,2$ нг/мл. У пухлинних зразках хворих із клінічно резистентним до ХТ РЯ виявлено вищі рівні експресії p53, які асоційовані зі зростанням експресії ФНП у пухлинах. Отримані результати щодо ролі ФНП у підтримці резистентності РЯ до ХТ можуть стати основою для розробки лікувальних підходів із використанням інгібіторів ФНП з метою профілактики формування резистентності РЯ до цисплатину.

ВСТУП

Рак яєчника (РЯ) — одна з найскладніших нозологій онкогінекології, його етіологія та патогенез остаточно не з'ясовані. Відсутність патогномонічних симптомів, раннє імплантаційне та лімфогенне метастазування зумовлюють те, що понад 70% випадків РЯ діагностується в розповсюдженій III–IV стадії. Такі пацієнтки потребують складного і тривалого комбінованого лікування із залученням різних підходів сучасної онкології. Зокрема, широке впровадження протягом останніх двох декад процедури хірургічного стадіювання, циторедуктивних операцій, обов'язкове застосування хіміотерапії (ХТ) похідними платини і таксанами дозволили досягти певного покращання результатів лікування [1]. Незважаючи на це, РЯ є основною причиною смерті онкогінекологічних пацієнток. Рецидиви захворювання виникають навіть при оптимальному об'ємі хірургічного лікування, відповідній ХТ, проведеній в неoad'ювантному та ад'ювантному режимах. Провідною причиною рецидиву є первинна чи набута резистентність РЯ до цитостатиків [1, 2]. Інтенсивні дослідження цієї проблеми дозволили виділити кілька груп механізмів, які спричиняють множинну хіміорезистентність (ХР) пухлинних клітин, а саме: функціонування систем зворотного транспорту лікарських засобів з клітини; внутрішньоклітинна детоксикація цитостатика; підвищена активність ДНК-репараз; порушення генетичних систем запуску апоптозу тощо [3–5].

Очевидно, що резистентність клітин РЯ до похідних платини є результатом дії кількох незалеж-

них механізмів. З одного боку, це механізми, що запобігають потраплянню похідних платини до ядра клітини та зв'язуванню з ДНК, блокуючи таким чином їх протипухлинну дію. Серед найчастіше наведених в літературі механізмів ХР є внутрішньоклітинна детоксикація тіоловмісними сполуками (глутатіон, металотіоніни), рівень яких підвищений у цитоплазмі клітин РЯ. Інактивація сполук платини відбувається за рахунок заміщення їх тіоловими групами [6]. Не менш важливим є вплив білків, що відповідають за транспорт лікарських засобів із клітини проти градієнта концентрації. Серед цих енергозалежних pomp є Р-глікопротеїн, MDR-2 (multidrug resistance protein-2), активний транспортер СTR-1 тощо [7]. Інші механізми ХР реалізуються за рахунок утворення в ядрах ракових клітин комплексів ДНК з платиною, внаслідок чого посилюється репарація ДНК, підвищується опірність ДНК до пошкоджень, порушується система апоптозу [4]. Зв'язані з платиною ділянки ДНК можуть видалятися білками, що розпізнають пошкодження (damage recognition proteins). Докази функціонування цього механізму отримані в системах *in vitro* [8] та в пацієнток з РЯ [9]. Важливим механізмом ХР до похідних платини є порушення функції гена p53. Мутації цього гена — індуктора апоптозу, спостерігають у 50–70% хворих на РЯ [10, 11].

Не лише внутрішньоклітинні механізми беруть участь у формуванні ХР. Важливу роль у цьому процесі відіграють елементи клітинного мікрооточення пухлини. У мікрооточенні РЯ виявлено

низку біологічно активних речовин, а саме металопротеїнази, цитокіни (фактор некрозу пухлин (ФНП), епідермальний фактор росту (ЕФР), трансформуючі фактори росту (ТФР)- α і ТФР- β , інтерлейкін (ІЛ)-1 тощо) [12]. Численні цитокіни, що беруть участь у регуляції проліферації та міжклітинних взаємодіях, можуть модифікувати відомі механізми ХР та формувати незалежні нові умови, що сприятимуть виживанню клітин РЯ після впливу на них цитостатиків. Зокрема, ФНП та ТФР- β є регуляторами проліферації, ангіогенезу, індукторами апоптозу тощо.

Мета дослідження — вивчення зв'язку між рівнями експресії цитокінів ФНП, ТФР- β та білка p53 у пухлинних зразках РЯ та клінічною відповіддю пухлини на ХТ цисплатином.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проаналізовано матеріал від 110 пацієнток з РЯ, які отримували комбіноване лікування з 1999 по 2003 р. на базі гінекологічного відділення Львівського державного онкологічного регіонального лікувально-діагностичного центру. Середній вік пацієнток становив 58,2 року, при цьому наймолодшій пацієнтці було 42 роки, а найстаршій — 70. Після хірургічного стадіювання РЯ І стадія за класифікацією FIGO була виявлена у 6 (5%) хворих, II — у 19 (17%), III — у 74 (68%), IV — у 11 (10%) хворих. За гістологічною будовою пухлини розподілялись таким чином: серозно-папілярних карцином — 36 (33%), низькодеференційованих карцином — 32 (29%), серозних аденокарцином — 27 (25%), псевдомуцинозних аденокарцином — 15 (12%).

Циторедуктивні операції виконано 49 хворим, відтак проведено 5–6 циклів ХТ за протоколом СР (циклофосфамід — 750 мг/м², цисплатин — 75 мг/м²). 61 пацієнтка отримала неoad'ювантну ХТ (3 цикли СР), циторедуктивне оперативне лікування з подальшою ад'ювантною ХТ.

Проведено аналіз тривалості безрецидивного періоду та розподілено пацієнток на групи із клінічною чутливістю та резистентністю до проведеної ХТ. Чутливими до використаної схеми ХТ вважали пухлинні процеси, які не проявляли ознак рецидивування протягом 12 міс після закінчення останнього циклу ХТ. Пухлини, що рецидивували протягом 12 міс після закінчення ХТ, вважали ХР. Із 61 хворої, яка отримувала неoad'ювантну ХТ і комбіноване лікування, у 30 (49%) не виявлено ознак рецидивування протягом 1 року після закінчення терапії (група клінічно чутливих до ХТ пухлинних процесів). Решту — 31 (51%) хвору віднесли до групи із клінічною резистентністю до ХТ.

Отримання первинних пухлинних культур РЯ [12]. Забір пухлинного матеріалу проводили безпосередньо в операційній у стерильних умовах. У стерильний флакон об'ємом 50 мл наливали 20 мл середовища RPMI-1640, поміщали в нього пухлинний зразок розміром близько 1 см³ та протягом 5 хв

транспортували його в лабораторію, де в стерильних умовах тканину переносили у пластикову чашку Петрі (d = 9 см), наповнену 5–6 мл свіжого середовища RPMI-1640 з гентаміцином. При потребі тканину очищували від жиру і ділянок некрозу, механічно подрібнювали на фрагменти 1–2 мм³, що збільшувало площу контакту тканини з розчином ферментів. Ферментативну дезагрегацію тканини здійснювали за допомогою 0,02% розчину колагенази (Worthington, USA) у ФСБ та розчину ДНКази (Worthington, USA, 3 мкг/мл ФСБ, рН 7,2) при кімнатній температурі протягом 20 хв. Суспензію клітин фільтрували; блокували залишкову ферментативну активність промиванням клітин у повному середовищі RPMI-1640, що містило 200 мкг/мл гентаміцину, 20% бичачої сироватки крові (Sigma), 25 мМ HEPES (Sigma) в об'ємі 5 мл; тричі промивали в 10 мл ФСБ (центрифугування при 1000 об./хв протягом 3 хв). Осад ресуспендували в повному середовищі RPMI-1640, що містило 200 мкг/мл гентаміцину, 10% телячої ембріональної сироватки крові (Sigma), 25 мМ HEPES (Sigma). Життєздатні клітини підраховували в камері Горяєва у наявності 0,1% водного розчину трипанового синього. Для роботи використовували суспензії, в яких кількість життєздатних клітин перевищувала 80%.

Отримані пухлинні клітини (500 тис./мл середовища RPMI-1640) інкубували в пластиковому або скляному культуральному посуді (найчастіше клітини висівали у пластикові культуральні чашки Costar, d = 5 см). Час інкубації становив 24 год у вологій камері, в атмосфері CO₂ при 37 °С.

Після інкубації поживне середовище зливали у конічні пробірки і центрифугували 7 хв при 1000 об./хв. Надосад збирали у пластикові пробірки і зберігали при –30 °С до визначення активності цитокінів.

Визначення активності ФНП проводили біологічним методом з використанням чутливих до ФНП культури клітин трансформованих мишачих фібробластів L-929 [12]. *Визначення активності ТФР- β* проводили біологічним методом із використанням чутливої до ТФР- β культури CCL-64 епітелію легень норки (Mv1Lu; American Type Culture Collection, Rockville, Md.) [12].

Імуногістохімічне дослідження експресії p53. Зразки пухлини були фіксовані у 10% формаліні та парафінізовані. Тканинні зрізи товщиною 4 мкм наносили на предметне скло, вкрите 0,5% желатином (Serva) із 0,4% K(Cr(SO₄)₂). Скельця підсушували при 37 °С 12 год, депарафінізували та регідратували у серії ксилолів (I, II) по 5 хв та спиртів (96; 90; 80; 70; 50%) по 2 хв. Візуалізацію p53 проводили кип'ятінням у мікрохвильовій печі (800 W) 3 рази по 3 хв у 0,1 м Na-цитратному буфері (рН 6,0). Ендогенну пероксидазу інгібували 3% пероксидом водню 5 ± 1 хв. Імуногістохімічне дослідження проводили, використовуючи первинні МкАТ до p53 (клон DO-7, DAKO) (експозиція 15–20 хв) та візуалізуючу систему LSAB[®]2 System (DAKO). Зрізи додатково

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

во забарвлювали гематоксиліном, промивали 37 мМ NH₄OH та наклеювали DAKO Faramount. Усі етапи виконували при кімнатній температура у вологій камері. Ступінь експресії p53 визначали за відношенням кількості позитивно забарвлених клітин до загальної кількості клітин у кожному з 10 полів зору ($\times 1500$). Експресію вважали негативною (–), якщо позитивну реакцію не спостерігали або визначали менше ніж у 10% клітин; слабким ступенем експресії (+) вважали позитивну реакцію у 10–25%, помірним ступенем (++) — у 25–50%, високим ступенем експресії (+++) — більше ніж у 50% забарвлених клітин.

Статистична обробка результатів. Достовірність різниці досліджених параметрів обраховували за критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У середовищі культур пухлин первинно прооперованих та хворих з передопераційною ХТ при узагальненому аналізі було визначено майже однакові рівні ФНП ($0,51 \pm 0,09$ та $0,54 \pm 0,12$ нг/мл відповідно). Проте при зіставленні результатів дослідження зразків пухлин з однаковою розповсюдженістю (III–IV стадія за FIGO) виявилось, що рівень ФНП у зразках після ХТ — істотно вищий ($0,54 \pm 0,12$ нг/мл), ніж у первинно прооперованих ($0,31 \pm 0,08$ нг/мл, $p < 0,05$). Між концентрацією ТФР- β у середовищі культур РЯ від первинно оперованих хворих та тих, яким проводили неoad'ювантну ХТ, виявлено обернену залежність. Зокрема, при розповсюджених стадіях РЯ у первинно оперованих пухлинах активність ТФР- β становила $5,45 \pm 0,91$ нг/мл, а після ХТ і операції — $3,72 \pm 1,20$ нг/мл (табл. 1).

Таблиця 1

Рівні ФНП та ТФР- β у середовищі первинних клітинних культур РЯ хворих із розповсюдженим захворюванням (III–IV стадія за FIGO)

Цитокін	Концентрація цитокіну, нг/мл	
	Хірургічне лікування (n = 49)	Неoad'ювантна ХТ + хірургічне лікування (n = 61)
ТФР- β	$5,45 \pm 0,91$	$3,72 \pm 1,20$
ФНП	$0,31 \pm 0,08$	$0,54 \pm 0,12$

У табл. 1 і 2: $p < 0,05$ (для ФНП).

Аналіз тривалості безрецидивного періоду дозволив розподілити пацієнок на групи клінічно чутливих і резистентних до проведеної ХТ. Особливу увагу спрямовано на групу хворих, які отримали передопераційну ХТ. У більшості з них (50 із 61 (82%)) об'єктивно (за даними УЗД, бімануально) визначали позитивний ефект від проведеного лікування, що дозволило виконати хірургічне втручання. Тобто 82% хворих демонстрували відповідь на ХТ. Проте у 25 (40 %) хворих протягом 12 міс після закінчення лікування діагностовано рецидиви РЯ. З 11 хворих, які не відповідали на неoad'ювантну ХТ, після комбінованого лікування у 5 не виявлено ознак прогресування хвороби, що дозволило віднести ці випадки до групи клінічно чутливих до ХТ.

У виділених таким чином групах хворих із клінічно чутливим та резистентним до ХТ РЯ проаналізовано рівні ФНП та ТФР- β . Виявлено суттєву різницю між рівнями ФНП: зокрема, концентрація цього цитокіну в середовищі пухлин клінічно резистентних до ХТ хворих була високою і сягала майже 0,8 нг/мл (табл. 2). Натомість, у підгрупі клінічно чутливих до ХТ пухлин відповідний показник був значно нижчим і становив $0,35 \pm 0,08$ нг/мл.

Таблиця 2

Концентрація ФНП та ТФР- β у середовищі первинних культур РЯ хворих, клінічно чутливих і резистентних до ХТ

Цитокін	Концентрація цитокіну, нг/мл	
	Клінічно чутливі до ХТ (n = 30)	Клінічно резистентні до ХТ (n = 31)
ТФР- β	$4,61 \pm 0,82$	$3,76 \pm 0,54$
ФНП	$0,35 \pm 0,08$	$0,79 \pm 0,13$

Концентрація ТФР- β у зразках клінічно чутливих та резистентних до ХТ пухлин також відрізнялась, була вищою в групі чутливих до ХТ пухлин ($4,6 \pm 1,2$ нг/мл) та знижувалась у групі резистентних до ХТ пухлин ($3,76 \pm 0,90$ нг/мл) (див. табл. 2).

При дослідженні експресії p53 позитивне забарвлення спостерігали загалом у 51% випадків. Експресія p53 при I–II стадії захворювання була негативною у 66,7% та середньою у 33,3% випадків. При РЯ III–IV стадії експресія p53 була негативною у 62,0% випадків, у 23,8% — середньою ($40,3 \pm 7,4\%$ клітин), і у 14,3% — високою ($58,7 \pm 4,8\%$ клітин). Ця відмінність була статистично достовірною. Серед зразків пухлин після циторедуктивних операцій експресію p53 виявлено в 30% випадків, після неoad'ювантної ХТ та операції — у 60%. Подальший аналіз інтенсивності експресії p53 виконували в групі хворих, які отримали неoad'ювантну ХТ, відтак були прооперовані.

У цій групі слабкий (+) ступінь експресії p53 виявлено у 31% хворих, помірний (++) — у 39%, а високий (+++) — у 30%. При аналізі зразків у групах клінічно чутливих та резистентних до ХТ виявлено статистично вірогідну різницю в частоті різних ступенів експресії p53. Високий ступінь експресії частіше відзначали в резистентній до ХТ підгрупі хворих (48%), відтак помірну і слабку експресію частіше виявляли в пухлинах, чутливих до ХТ (табл. 3).

Таблиця 3

Розподіл хворих на РЯ за експресією p53 у тканині пухлини та клінічною чутливістю та резистентністю до ХТ

Чутливість до ХТ	Розподіл хворих за експресією p53 у тканині РЯ, n (%)			
	Відсутня (–)	Слабка (+)	Помірна (++)	Висока (+++)
Пухлини, клінічно чутливі до ХТ	3 (10,0)	12 (39,0)	15 (49,0)	0 (0,0)
Пухлини, клінічно резистентні до ХТ	5 (16,1)	4 (12,9)*	6 (19,4)*	15 (48,0)*

* $p < 0,05$.

При аналізі зв'язку експресії p53 та концентрації ФНП виявлено зростання останньої із підвищенням рівня експресії p53 у тканині пухлини. Зокрема, більшу концентрацію ФНП спостерігали у середовищі культур пухлин з високою експресією p53 порівняно з культурами пухлин із слабкою експе-

сію p53 або її відсутність ($1,20 \pm 0,40$ проти $0,48 \pm 0,12$ нг/мл) (рисунок).

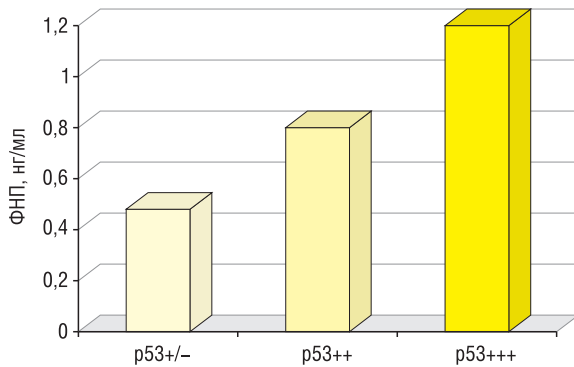


Рисунок. Концентрація ФНП у середовищі первинних клітинних культур РЯ із різною експресією білка p53 у тканині пухлини

Таким чином, продемонстровано вищі рівні ФНП у зразках РЯ, клінічно резистентних до дії цисплатину. Імовірно ФНП проявляє себе як фактор виживання ракових клітин, що зазнали токсичного впливу. Вважають, що ФНП відіграє важливу роль у біології клітин РЯ; зокрема, його рівні значно зростають при РЯ, корелюючи із таким параметром агресивності, як ступінь диференціації клітин [13]. За даними M. Sueldo та співавторів [5], резистентні до цисплатину клітини РЯ є нечутливими також до проапоптотичного впливу ФНП. Нагадаємо, що до факторів виживаності відносять низку білків, які сприяють блокаді проапоптотичних стимулів. Зокрема, це білки родини IAP, які вперше були виявлені у бакуловірусів. До родини білків IAP людини належать Xiap, Nipar-1.-2, Nipar, сурвівін (surviving) та лівін (livin) [14]. Функціонування цих білків захищає клітину від загибелі. У чутливих до ХТ пухлинах рівень експресії Xiap знижується під впливом цисплатину. Натомість, однією із основ ХР є нездатність цисплатину пригнічувати Xiap [13].

Попередніми дослідженнями в експерименті встановлено, що ФНП може модифікувати експресію білків, які зумовлюють резистентність клітини до цисплатину. Зокрема, ФНП здатен пригнічувати Xiap у клітинах РЯ, внаслідок чого у них не запускається під дією додаткових апоптогенних чинників апоптоз [13]. Наші результати свідчать на користь даних про роль ФНП у формуванні резистентності пухлин (зокрема РЯ) до ХТ.

У тканинних зразках РЯ виявлено певні відмінності в експресії ТФР- β під впливом ХТ. Спостерігали тенденцію до зниження рівня ТФР- β у поживному середовищі первинних пухлинних культур від хворих після неoad'ювантної ХТ. Нижчі концентрації цитокіну виявили і у клінічно резистентних до ХТ РЯ. ТФР- β є інгібуємим ріст цитокіном щодо епітеліальних клітин [15]. Проте в ході пухлинної прогресії ракові клітини втрачають чутливість до його рістгальмівної дії [15, 16]. У багатьох злякисних пухлинах, в тому числі і в РЯ, виявлено доволі значні рівні експресії цього цитокіну. В таких випадках дія

цитокіну може навіть змінюватися з ріст-інгібуючої на ріст-індукуючу внаслідок порушення внутрішньоклітинної передачі сигналу. Зокрема, для певних РЯ характерною є зміна продукції ТФР- β , переважно у бік зростання та втрати рецепторів ТФР- β з поверхні клітин. Зазначені зміни призводять до значного порушення передачі сигналу від ТФР- β , особливо у рецидивному та ХР РЯ [15].

Пошкодження гена p53 (втрата алелі, мутація чи гіперекспресія) часто спостерігаються у карциномах яєчника. Успадкований та спорадичний РЯ характеризуються однаковою частотою мутацій гена p53 [17]. Нами продемонстровано, що тканина резистентного до ХТ РЯ характеризується вищим ступенем експресії p53 у ядрах клітин, ніж тканина чутливого до ХТ РЯ. Виявлено також, що вищі рівні експресії p53 асоційовані зі зростанням експресії ФНП. Вірогідне пояснення такого зв'язку може знаходитися на рівні механізмів регуляції транскрипції обох білків.

Гени, що кодуєть синтез ФНП, мають ділянки з'єднання з активатором транскрипції NF κ B поблизу їх промоторів [18]. ФНП активує експресію NF κ B, підвищує приєднання NF κ B до промотора гена p53 [19]. Опосередкована через NF κ B активація транскрипції гена p53 відбувається у відповідь на гіпоксію/реоксигенацію [18]. Експресія p53 є вищою на запущених стадіях захворювання. На I–II стадії частота та ступінь експресії p53 були нижчими, а на III–IV — вищими, що також продемонстровано у наших попередніх дослідженнях [20]. У процесі розвитку захворювання, очевидно, відбувається нагромадження частоти мутацій гена p53, хоча існує думка, що різні альтерації цього гена відбуваються лише на початку розвитку РЯ [21]. Функціональною активністю p53 визначається можливість розвитку Xiap-залежної ХР [13]. Цисплатин активує p53, однак це продемонстровано на чутливих до ХТ клітинах, коли у ХР такої активації не спостерігається [13].

Отримані результати щодо ролі ФНП у підтримці резистентності РЯ до ХТ вказують на доцільність застосування інгібіторів ФНП з метою профілактики формування резистентності РЯ до цисплатину.

ВИСНОВКИ

1. Зростання експресії ФНП та нижчі рівні експресії ТФР- β виявлено в зразках РЯ, які клінічно проявили себе як резистентні до ХТ.

2. У поживному середовищі первинних культур РЯ, видаленого у хворих, яким проведено 3 цикли неoad'ювантної ХТ, виявлено зростання рівня ФНП поряд зі зниженням ТФР- β , на відміну від первинних культур РЯ хворих, лікування яких починалось із хірургічного.

3. У пухлинних зразках хворих із клінічно резистентним до ХТ РЯ виявлено вищі рівні експресії білка p53, які асоційовані зі зростанням експресії ФНП в пухлинах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Воробьева ЛИ, Доценко ЮС, Винницкая АБ и др. Фармакотерапия злокачественных опухолей женских гениталий. Фармакол Вісн 2000; 1: 59–63.
2. Горбунова ВА, Хохлова СВ, Бесова НС и др. Эффективность и токсичность комбинации такотер и цисплатин в первой линии химиотерапии у больных распространенным раком яичников. Вопр Онкол 2001; 47 (5): 1–6.
3. Чехун ВФ, Шишова ЮВ. Современные взгляды формирования лекарственной устойчивости опухолей. Онкология 2000; 2 (1): 11–5.
4. Kelland LR. Preclinical perspectives on platinum resistance. Drugs 2000; 59 (Suppl 4): 1–8.
5. Cuello M, Eftenberg SA, Nau MM, et al. Synergistic induction of apoptosis by the combination of TRAIL and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. Gynecol Oncol 2001; 81 (3): 380–90.
6. Piccart MJ, Lamb H, Vermorken JB. Current and future potential roles of platinum drugs in treatment of ovarian cancer Ann Oncol 2001; 12: 1195–203.
7. Samimi G, Safaei R, Katano K, et al. Increased expression of copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, oxaliplatin in ovarian cancer cells. Clin Cancer Res 2004; 10: 4661–9.
8. O'Neill CF, Koberle B, Masters JRW, et al. Gene-specific repair of Pt/DNA lesion and induction of apoptosis by the oral platinum drug JM216 in three human adenocarcinoma cell lines sensitive and resistance to cisplatin. Br J Cancer 1999; 81: 1294–303.
9. Giaccone G. Clinical perspectives on platinum resistance. Drug 2000; 59: 9–17.
10. Ferreira CA, Tolis C, Giaccone G. P-53 and chemosensitivity Ann Oncol 1999; 10: 1011–21.
11. Fu S, Kavanagh JJ, Huw, et al. Clinical application of oxaleptin in epithelial ovarian cancer. Inter. J Gynecol Cancer 2006; 16: 1717–32.
12. Володько НА. Метастазування злоякісних пухлин: роль факторів пухлинного мікроточення. Львів: Медицина світу, 2002. 198 с.
13. Fraser M, Leung B, Jahani-Asl A, et al. Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators [review]. Reproduct Biol Endocrinol 2003; 1: 66.
14. Krambeck A, Dong H, Thompson P, et al. Survivin and b-7h-7 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2007; 15: 1749–56.
15. Bristow RE, Baldwin RL, Yamada SD, et al. Altered expression of transforming growth factor- β ligands and receptors in primary and recurrent ovarian carcinoma. Cancer 2000; 85: 658–68.
16. Stoika RS, Yakymovych MY, Yakymovych IA, et al. Cisplatin resistant derivatives of murine L1210 leukemia cells are not susceptible to growth inhibiting and apoptosis — inducing actions of transforming growth factor- β 1. Anti-cancer drugs 1999; 10: 457–63.
17. Lieberman DA, Hoffman B, Stainmann RA. Molecular control of growth arrest and apoptosis: p53 dependant and independent pathways. Oncogene 1995; 11: 199–210.
18. Liu Z, Hsu H, Goeddel DV, et al. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF κ B activation prevents cell death. Cell 1996; 87: 565–76.

19. Makin J, Dive C. Modulating sensitivity to drug induced apoptosis: the future for chemotherapy? Breast cancer 2001; 3 (3): 150–3.

20. Ломницька МІ, Володько НА, Барилка ВА та ін. Зв'язок ангиогенезу в раку яєчника людини з експресією білків p53 і BRCA1, продукцією цитокінів ФНП- α та ТФР- β . Онкологія 2005; 7 (3): 195–200.

21. McManus DT, Yap EP, Maxwell P, et al. p53 expression, mutation and allele deletion in ovarian cancer. J Pathol 1994; 147: 159–68.

TNF, TGF- β AND p53 EXPRESSION IN CELLS OF CISPLATIN SENSITIVE AND RESISTANT OVARIAN CARCINOMA

N.A. Volodko, M.I. Lomnytska, Y.B. Chernykh, V.A. Barylka

Summary. Relationship was studied between the expression levels of TNF, TGF- β , and p53 in samples from ovarian carcinoma (OC) and clinical response of the tumor to cisplatin-based chemotherapy (CT). The growing media of primary OC cell cultures clinically resistant to CT showed significantly higher TNF levels ($0,79 \pm 0,13$ ng/ml) compared to the media of tumor cell cultures sensitive to CT ($0,35 \pm 0,08$ ng/ml; $p < 0.05$). TGF- β expression in the OC samples clinically sensitive and resistant to CT was higher in the group of CT-sensitive tumors ($4,60 \pm 1,20$ ng/ml) and decreased in the group of resistant tumors ($3,76 \pm 0,90$ ng/ml). The TNF expression level in OC after 3 cycles of neoadjuvant CT was higher ($0,54 \pm 0,12$ ng/ml) compared to primary operated patients ($0,31 \pm 0,08$ ng/ml). Samples of primary operated OC showed a TGF- β level of $5,45 \pm 0,91$ ng/ml, while samples of tumors from patients who underwent both CT and surgery showed a TGF- β level of $3,72 \pm 1,2$ ng/ml. Tumor samples from patients with clinically CT-resistant OC showed higher levels of p53 associated with the increased TNF expression in tumors. These findings show the role of TNF in the maintenance of OC resistance to CT and can be a basis for the development of treatment approaches with the use of TNF inhibitors with the view to prevent OC resistance to cisplatin.

Key Words: ovarian carcinoma, drug resistance, cisplatin, tumor microenvironment, TNF, TGF- β , p53.

Адреса для листування:

Володько Н.А.
79000, Львів, вул. Марка Вовчка, 14/6
Львівський національний медичний
університет ім. Данила Галицького,
кафедра онкології та медичної радіології
E-mail: nvolodko@yahoo.com