

*Ростислав ПАНЧУК, Наталія БОЙКО, Максим ЛУЦИК,  
Ростислав СТОЙКА*

## **РОЛЬ ЦИТОКІНІВ У МЕХАНІЗМАХ КАХЕКСІЇ, ЗУМОВЛЕНОЇ ПУХЛИННИМ РОСТОМ**

*Інститут біології клітини НАН України*

*Мета нашої праці — ідентифікувати прозапальні цитокіни, які можуть бути задіяні в розвитку ендогенної інтоксикації в мишей з лімфомою NK/Ly та дослідити динаміку їх змін в контрольній групі та в тварин, що проходили курс хіміотерапії. Показано, що в пухлинних клітинах простежується зростання рівня мРНК інтерлейкіну-6 (IL-6) на пізніх стадіях пухлинного росту, водночас рівень мРНК васкулярного ендотеліального фактору росту (VEGF) був високий, однак суттєво не коливався. Імуноензиматичний аналіз підтвердив дані RT-PCR по IL-6 (90 пг/мл на ранній стадії пухлинного росту і 570 пг/мл на термінальній). Також показано високий рівень IFN- $\gamma$  в асцитній рідині на початку розвитку лімфоми, і його різке падіння на термінальних стадіях її розвитку (120 пг/мл і 30 пг/мл, відповідно). Після хіміотерапії різними протипухлинними агентами (доксорубіцин, вінкристин, дексаметазон) простежувалось падіння рівня IL-6 у асцитній рідині до 1200 пг/мл, і зростання рівня IFN- $\gamma$  на пізніх стадіях росту пухлини (180 пг/мл, порівняно з 30 пг/мл у контрольній групі).*

*На підставі цих досліджень показано, що IL-6 може бути головною причиною запальних процесів і загальної інтоксикації організму тварин-пухлиноносців з лімфомою NK/Ly, а IFN- $\gamma$ , навпаки, виступати як цитокін, високий рівень якого позитивно корелює з виживанням тварин.*

Численні побічні ефекти життєдіяльності пухлини (відомі під загальною назвою «кахексія») трапляються в анамнезі більшості онкохворих. Незважаючи на значний прогрес сучасної науки у дослідженні цього явища, молекулярні механізми кахексії до кінця нез'ясовані. Відомо, що у такому процесі задіяно багато прозапальних цитокінів, нейропептидів, гормоноподібних сполук та ін [2, 8]. Водночас мало відомо про перебіг патологічних процесів, які відбуваються при лейкеміях і лімфомах, позаяк основна маса досліджень з кахексії виконана на солідних моделях пухлин. Лімфома NK/Ly — одна з небагатьох лімфом, яка проявляє ендотоксичні ефекти, що нагадують кахексію.

Асцитну пухлина NK/Ly вперше дослідили в 1961 р. Немет і Келлнер [5], і ідентифікували її як лімфому за морфологічними та клінічними критеріями. Середня тривалість життя мишей-пухлиноносців становить

21–24 дні, починаючи з II стадії пухлинного росту (12–13 днів), у тварин проявляється багато типових кахектичних ознак: втрата маси тіла, запальні процеси, загальна інтоксикація. Молекулярні механізми цього феномену в лімфомі NK/Ly не вивчали, що і зумовило вибір нашого об'єкту досліджень.

Лімфому NK/Ly отримали в клітинному банку Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАНУ, Київ. Пухлину підтримували за допомогою доочеревинного перещеплення 0.2 – 0.3 мл асцитної рідини (20 – 30 млн клітин) на 7 – 8 день росту лімфому від тварини-пухлиноносія до тварини-реципієнта. Ріст пухлини контролювали щоденним зважуванням мишей. Кількість живих клітин в асцитній рідині, яку використовували для інокуляції, була не нижче 98 %.

Відбір асциту для досліджень проводили на 7 – 8, 13 – 14 та 20 – 21 дні після інокуляції пухлини. В кінці експерименту робили розтин тварин і зважували їхні органи. Особливу увагу приділяли печінці, селезінці, мозку, а також каркаській вазі (маса тіла тварини після усунення внутрішніх органів, голови, шкіри, хвоста і лап).

Досліджувані протипухлинні препарати виробництва “Ebeve” (адріаміцин), “Pierre Fabre” (вінкристин), “KRKA” (дексаметазон). Протипухлинні агенти вводили мишам доочеревинно, курс хіміотерапії складався з 10 ін'єкцій з інтервалом в один день, і починався на п'ятий день після інокуляції лімфому.

Для ідентифікації цитокінів, які можуть бути задіяні в розвитку кахексії в лімфомі NK/Ly, ми використали метод зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) із специфічними праймерами до 7 цитокінів (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , VEGF і IL-6) (див. табл.)

Таблиця

Праймери, використані для RT-PCR

Ген	Праймери	Послідовність
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>IL1a-for</b> <b>IL1a-rev</b>	5'-GCCAGTTGAGTAGGATAAAGG-3' 5'-CAGTCTGTCTCCTTCTTGAGG-3'
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL1b-for</b> <b>IL1b-rev</b>	5'-GTGTGATGTTCCCATACACA-3' 5'-TGAGAGGTGCTGATGTACCA-3'
<b>IL-6</b>	<b>IL6-for</b> <b>IL6-rev</b>	5'-TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG-3' 5'-TCTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC-3'
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>TNF<math>\alpha</math>-for</b> <b>TNF<math>\alpha</math>-rev</b>	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3' 5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	<b>TNF<math>\beta</math>-for</b> <b>TNF<math>\beta</math>-rev</b>	5'-CCCATCCACTCCCTCAGAAG-3' 5'-CGCACTGAGGAGAGGCACAT-3'
<b>VEGF</b>	<b>v-for</b> <b>v-rev</b>	5'-GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT-3' 5'-GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA-3'
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>IFN-for</b> <b>IFN-rev</b>	5'-GATCCTTTGGACCCCTCTGACT-3' 5'-AGACAGTGATAAACTATAAATTGAGCG-3'
<b><math>\beta</math>-actin</b>	<b>act-for</b> <b>act-rev</b>	5'-TCACCCACACTGTGCCCTTA-3' 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAA-3'

Тотальну РНК виділяли з пухлинних клітин за допомогою реагенту Trizol (Sigma, США). Далі до зразків додавали по 0.2 мл хлороформу («Реахим», РФ) з розрахунку на 1 мл реагенту Trizol, вміст енергійно переміщували та центрифугували протягом 15 хв при 12 000 g ( $t = 2 - 8^{\circ}\text{C}$ ). Відбирали верхню водну фазу в окрему пробірку типу Еппендорф. РНК осаджували ізопропанолом (0.5 мл на 1 мл доданого реагенту Trizol), інкубували протягом 10 хв при  $15 - 30^{\circ}\text{C}$  і центрифугували 10 хв при 12 000 g ( $t = 2 - 8^{\circ}\text{C}$ ). Отриманий осад промивали 75% етиловим спиртом (1 мл на 1 мл доданого реагенту Trizol), переміщували на центрифугу Vortex та повторно центрифугували протягом 5 хв при 7500 g ( $t = 2 - 8^{\circ}\text{C}$ ). Безпосередньо перед зворотною транскрипцією зразки РНК розчиняли у вільній від РНКаз воді, обробленій диетилпірокарбонатом, DEPC, (Sigma, USA).

Концентрацію РНК в розчині розраховували за формулою

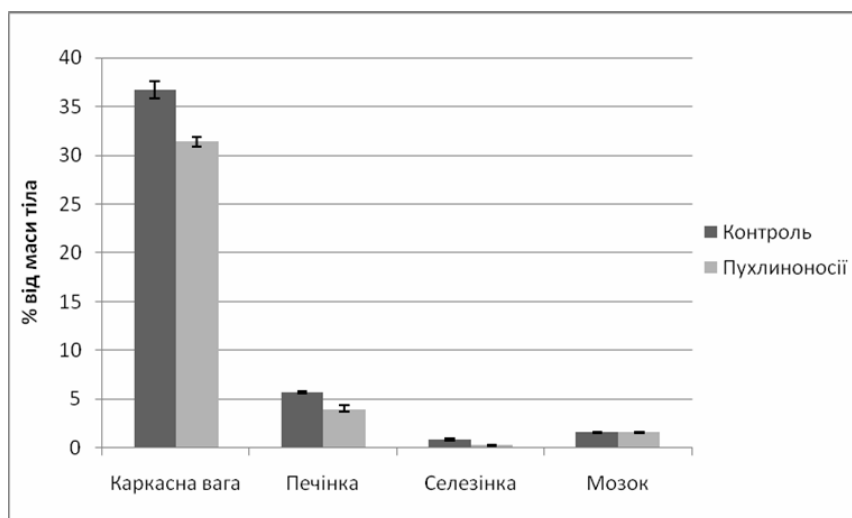
$$C_{RNA} = A_{260} \cdot 40 \cdot \frac{1000}{5} \cdot \frac{1}{1000} = A \cdot 8.$$

У середньому вона становила 3 мкг/мкл.

Зворотну транскрипцію проводили відповідно інструкцій First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва), а умови ПЛР були підібрані експериментально і становили  $94^{\circ}\text{C}$ ,  $55^{\circ}\text{C}$  та  $72^{\circ}\text{C}$  (30 циклів) для цитокінів, та  $94^{\circ}\text{C}$ ,  $65^{\circ}\text{C}$  та  $72^{\circ}\text{C}$  (25 циклів) для  $\beta$ -актину, що слугував контролем рівномірності нанесення проб. Електрофорез ПЛР-продуктів проводили у ТЕ-буфері (20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH = 7.5), 1% агарозі, етидію бромід вносили безпосередньо в гель. Електрофорез проводили при напрузі 5 V/cm до міграції мітки бромфенолового синього на 2/3 довжини гелю. ДНК фарбували етидію бромідом (2 мкг/мл, «Реахим») і фотографували на транслюмінаторі (Macro Vue UV-20, Hoeffer Pharmacia Inc., USA) за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5000. Кількість ДНК у кожному зі зразків на електрофореграмі визначали за допомогою програми GelPro 3.1 (Media Cybernetics, США).

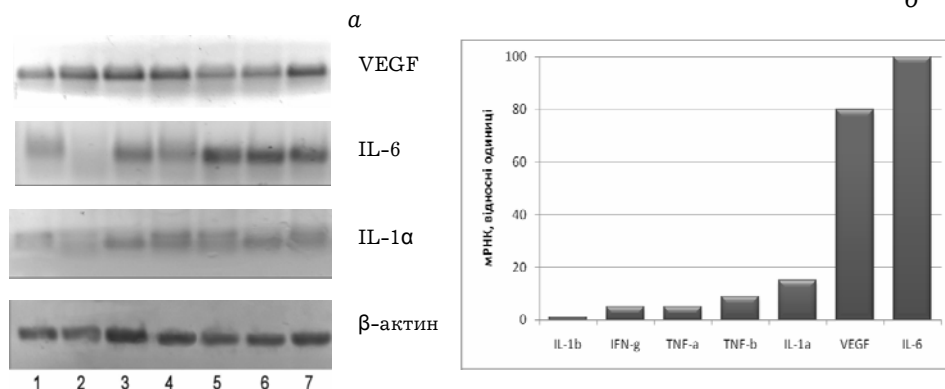
Набори для імуноензиматичного аналізу (ELISA) для IL-6 та IFN- $\gamma$  придбали в eBioscience (San Diego, США) і використовували відповідно до інструкцій виробника. Межа вимірювання становила 4 пг/мл для IL-6 та 15 пг/мл для IFN- $\gamma$  згідно з даними виробника. Дослідження проводились в вільній від клітин асцитній рідині, а сироватку крові, взяту від здорових тварин, використовували як контроль. Статистична обробка виконана за Стьюдентом, у кожній групі (6 – 8 мишей) досліди повторювали 3 рази.

На термінальних стадіях росту лімфоми у тварин проявляються типові ознаки кахексії (див. рис. 1), які виявляються у погіршенні фізіологічного стану, втраті маси скелетних м'язів, печінки та селезінки, водночас маса життєво важливих органів, таких як серце і мозок, залишається незмінною.



**Рис. 1.** Деякі патофізіологічні показники тварин-пухлиноносіїв з лімфомою NK/Ly (відмінності в каркасній вазі, масі печінки і селезінки є статистично достовірними,  $P < 0.001$ ).

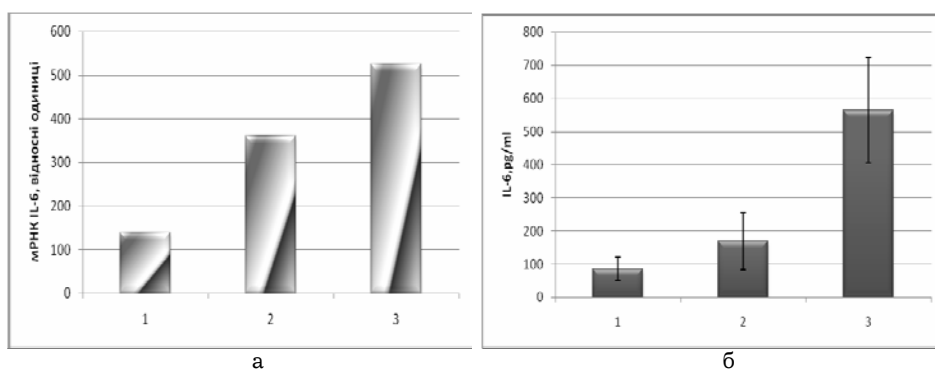
б



**Рис. 2.** (а) Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР-реакції з праймерами до мРНК деяких цитокінів у клітинах лімфоми NK/Ly. 1, 2, 3 — зразки з 1-го дренажу (6–7 днів після інокуляції лімфоми), 4, 5 — зразки з 2-го дренажу (13–14 днів після інокуляції лімфоми), 6, 7 — зразки з 3-го дренажу (20–21 днів після інокуляції лімфоми). (б) Порівняльний аналіз досліджуваних цитокінів на 3-ій стадії пухлинного росту (20 днів після інокуляції пухлини). Дані нормалізовано стосовно до бета-актину.

Дані денситометричного аналізу ПЛР-продуктів реакції з праймерами до 7 цитокінів зображено на рис. 2. За результатами RT-PCR у пухлинних клітинах спостерігається високий рівень експресії мРНК лише двох

цитокінів — IL-6 та VEGF. Відомо, що VEGF — один з ключових цитокінів, який задіяний при канцерогенезі, і високий рівень його експресії приводить до формування асцити та дегідратації периферійних тканин, погіршуючи загальний фізіологічний стан тварин [3, 6]. Оскільки рівень мРНК інших досліджуваних цитокінів (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) перебував на низькому рівні, ми вважаємо, що ці цитокіни не відіграють значної ролі у формуванні ендогенної інтоксикації, що супроводжує розвиток лімфоми NK/Ly. Ми не виявили суттєві зміни в експресії VEGF на ранніх і пізніх стадіях пухлинного росту (див. рис. 2, а), водночас рівень мРНК IL-6 зростає в 4 рази порівняно з початковою стадією розвитку лімфоми. Імуноензиматичний аналіз підтвердив дані RT-PCR по IL-6 (див. рис. 3).



**Рис. 3.** Зміна концентрації IL-6 у пухлинних клітинах та асцитній рідині на різних стадіях пухлинного процесу: (а) Експресія мРНК IL-6 у пухлинних клітинах, (б) Рівень IL-6 у асцитній рідині.

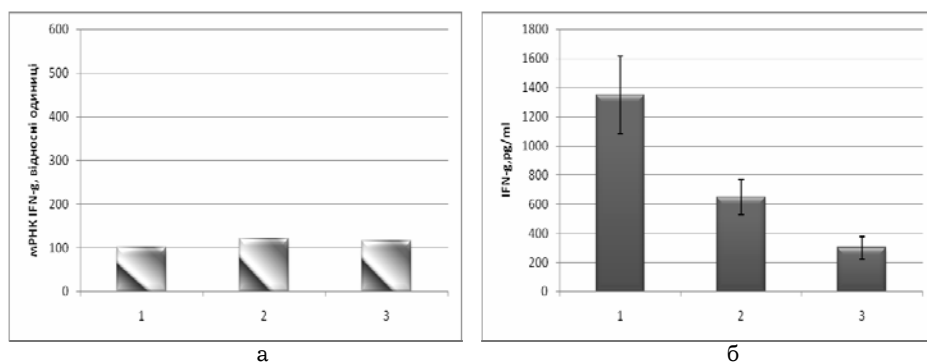
Показано, що концентрація IL-6 на ранніх стадіях розвитку асцити (1-ий дренаж, 6–7 днів після інокуляції пухлини) становила 90 пг/мл, і різко зростала (до 570 пг/мл) на термінальній стадії пухлинного росту (20–21 день після інокуляції асцити).

IL-6 — цитокін із плеїотропними механізмами дії, що задіяний в розвитку різноманітних процесів, у тім числі і при кахексії [7]. Пухлинні клітини різного походження часто експресують IL-6 та його рецептори, його підвищений рівень виявили в плазмі крові в онкохворих з різними видами злоякісних новоутворень [1, 4]. Враховуючи різке зростання концентрації IL-6 на пізніх стадіях канцерогенезу, ми припускаємо, що саме він задіяний в ендотоксичних процесах, які відбуваються при патогенезі лімфоми NK/Ly. На відміну від IL-6, інший цитокін, IFN- $\gamma$ , демонстрував дещо іншу динаміку змін. Зворотна полімеразна ланцюгова реакція засвідчила, що експресія мРНК інтерферону-гамма в пухлинних клітинах була на дуже низькому рівні протягом усіх стадій росту лімфоми, однак в асцитній рідині простежувалась протилежна ситуація. На 6–7 день розвитку пухлини рівень IFN- $\gamma$  становив 1200 пг/мл, однак пізніше різко

падав до 30 пг/мл на термінальній фазі росту лімфоми (20 – 21 день після інюкуляції) (див рис. 4).

Цей феномен можна пояснити тим, що IFN- $\gamma$  продукується не лімфомними клітинами, а імунною системою, і таке різке падіння його концентрації зумовлене пригніченням діяльності імунної системи пухлиною NK/Ly. Також виявлено сильну негативну кореляцію ( $r = 0.9$ ) між рівнем IL-6 у асциті та кількістю мертвих лімфомних клітин, і позитивну кореляцію між концентрацією IL-6 в асциті та кількістю макроцитів (клітин з збільшеними розмірами).

Одержані дані дають змогу припустити, що IL-6, крім негативної дії на фізіологічний статус організму, також може певним чином впливати і на самі лімфомні клітини, які його продукують.

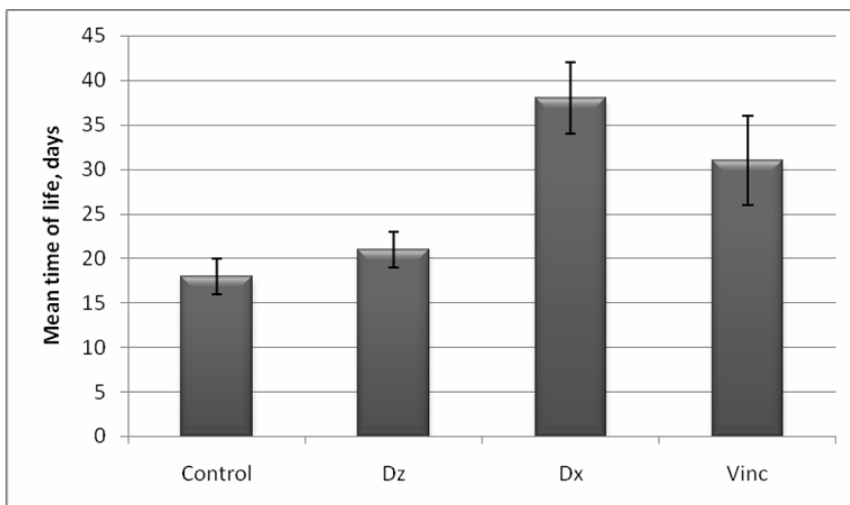


**Рис. 4.** Зміна концентрації IFN- $\gamma$  у пухлинних клітинах та асцитній рідині на різних стадіях пухлинного процесу; (а) експресія мРНК IFN- $\gamma$  у пухлинних клітинах, (б) рівень IFN- $\gamma$  у асцитній рідині.

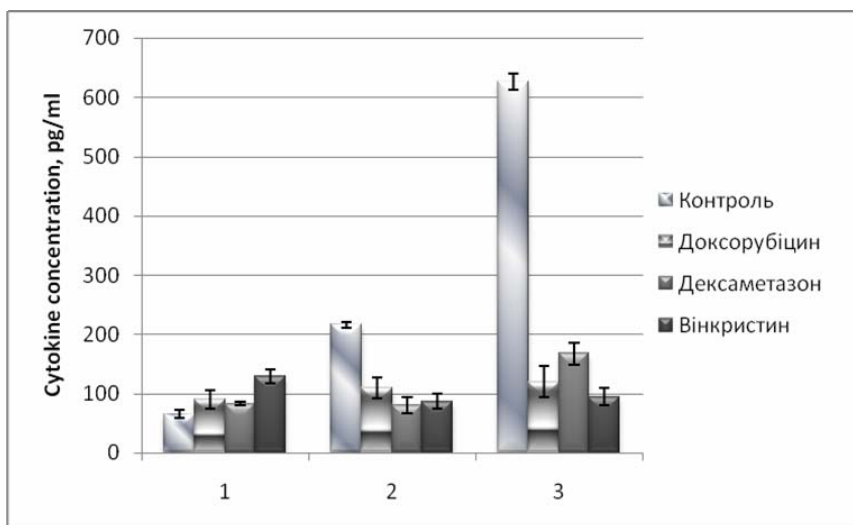
Відомо, що хіміотерапія далеко не завжди призводить до позитивного результату, інколи лише погіршуючи загальний стан пацієнта. Наступне завдання нашої праці — дослідити рівні IL-6 та IFN- $\gamma$  при хіміотерапії мишей з лімфомою NK/Ly протипухлинними агентами з різними механізмами дії: дексаметазоном, вінкрістином і доксорубіцином, які широко використовують при лікуванні пухлин лейкоїдного походження. Тривалість життя мишей-пухлиноносіїв, що отримували курс хіміотерапії, показано на рис. 5.

Найбільш суттєво цей показник зростав у тварин, що отримували доксорубіцин та вінкрістин — до 38 та 32 днів, відповідно, водночас дексаметазон суттєво не продовжував тривалість життя мишей — до 22 днів порівняно з 20 – 21 днів у контрольній групі. Імуноензиматичний аналіз засвідчив, що у всіх дослідних груп тварин, які проходили курс хіміотерапії, простежувалось суттєве падіння рівня IL-6 на термінальній стадії росту лімфоми до 120 пг/мл (порівняно з 570 пг/мл у тварин, що не проходили лікування) (див. рис. 6). Динаміка IFN- $\gamma$  при терапії дексаметазоном суттєво не змінювалась, у мишей, що отримували доксорубіцин чи вінкрістин, на термінальній стадії розвитку лімфоми було виявлено

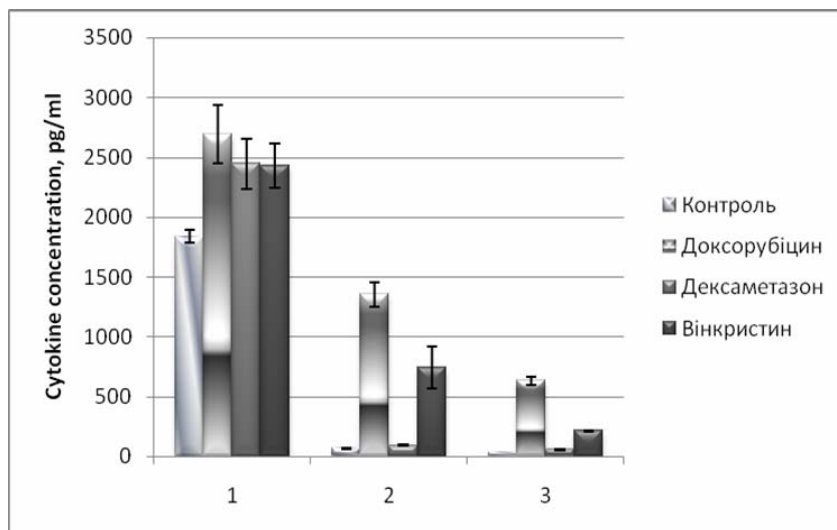
зростання рівня IFN- $\gamma$  в 6 разів порівняно з контролем (180 пг/мл і 30 пг/мл, відповідно) (див. рис. 7).



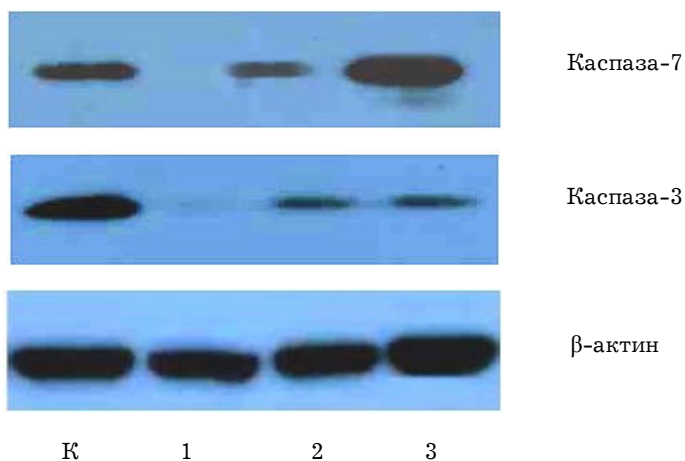
**Рис. 5.** Середня тривалість життя мишей з лімфомою NK/Ly та при хіміотерапії: Dz — дексаметазон, Dx — доксорубіцин, Vinc — вінкрістин.



**Рис. 6.** Вплив хіміотерапії на концентрацію IL-6 у асцитній рідині мишей з лімфомою NK/Ly на різних стадіях пухлинного процесу.



**Рис. 7.** Вплив хіміотерапії на концентрацію IFN- $\gamma$  у асцитній рідині мишей з лімфомою NK/Ly на різних стадіях пухлинного процесу.



**Рис. 8.** Вплив хіміотерапії доксорубіцином на експресію проапоптичних білків в клітинах NK/Ly мишей-пухлиноносіїв.

Пояснити цей феномен можна так. Відомо, що дексаметазон є потужним протизапальним стероїдним агентом, який активно інгібує експресію усіх прозапальних цитокінів, у тім числі IL-6, який відіграє негативну роль у перебігу лімфоми NK/Ly, і IFN- $\gamma$ , який, навпаки, підвищує опірність організму й імунної системи до лімфоми. За рахунок такого „зрівноважування” ефектів дексаметазон не дає бажаних результатів при ліку-



ванні такої пухлини. Доксорубіцин і вінкрістин діють по-іншому, індукуючи апоптоз у лімфомних клітинах (зокрема, це видно з експресії у них активних форм каспази-7 та каспази-3, див. рис. 8) і тим самим механічно знижуючи їхню кількість і рівень ІЛ-6, який вони продукують. За рахунок цього зменшується тиск пухлини на імунну систему тварини, що, за нашими припущеннями, призводить до зростання рівня ІFN- $\gamma$ , який підвищує опірність організму до пухлини.

Отже, на підставі отриманих даних можна зробити такі висновки.

1. Ідентифіковано два цитокіни, які відіграють важливу роль у формуванні ендогенної інтоксикації при розвитку мишачої лімфоми NK/Ly — ІЛ-6 та ІFN- $\gamma$ .
2. Показано, що високий рівень ІЛ-6 та падіння рівня ІFN- $\gamma$  негативно корелює з тривалістю життя тварин-пухлиноносіїв.
3. Хіміотерапевтичні агенти доксорубіцин і вінкрістин індукують апоптоз в лімфомних клітинах та призводять до різкого зниження концентрації ІЛ-6 та зростання концентрації ІFN- $\gamma$  в асцитній рідині, що позитивно корелює з виживанням тварин.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Argiles J.M., Busquets S. and Lopez-Soriano F.J.* Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* — 2003. — Vol. 6. — P. 401 – 406.
2. *Inui A.* Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Are Neuropeptides the Key? // *Cancer Res.* — 1999. — Vol. 59. — P. 4493 – 4501.
3. *Koukourakis M.I., Papazoglou D., Giatromanolaki A., Bougioukas G., Maltezos E. and Sivridis E.* VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer // *Lung Cancer* — 2004. — Vol. 43. — P. 293 – 298.
4. *Martignoni M.E., Kunze P., Hildebrandt W., Kunzli B., Berberat P., Giese T., Kloters O., Hammer J., Buchler M.W., Giese N.A. and Friess H.* Role of mononuclear cells and inflammatory cytokines in pancreatic cancer-related cachexia // *Clin. Cancer. Res.* — 2005. — Vol. 11. — P. 5802 – 5808.
5. *Nemeth L., Kellner B.* A new mouse ascites tumor to be used as screening tool // *Neoplasma* — 1961. — Vol. 8. — P. 337 – 343.
6. *Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S. and Dvorak H.F.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid // *Science* — 1983. — Vol. 219. — P. 983 – 985.
7. *Strassmann G., Fong M., Kenney J., Jacob C.O.* Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia // *J. Clin. Invest.* — 1992. — Vol. 89. — P. 1681 – 1684.
8. *Tisdale M.J.* Pathogenesis of Cancer Cachexia // *J Support Oncol.* — 2003. — Vol. 1. — P. 159 – 168.

**SUMMARY****Rostyslav PANCHUK, Natalia BOIKO, Maxim LOOTSIK, Rostyslav STOIKA****ROLE OF CYTOKINES IN THE MECHANISMS OF CACHEXIA,  
INDUCED BY TUMOR GROWTH***Institute of Cell Biology NASU*

Cachexia is one of the major complications which appear at terminal stages of tumor progression. The molecular mechanisms of tumor-associated cachexia are still poorly understood. The main goal of this study was to identify cytokines, which could be involved in the development of endogenous intoxication in mice with NK/Ly lymphoma, and to investigate changes of their levels in ascitic fluid during early and terminal stages of tumor growth.

The expression of VEGF mRNA stayed at high level and did not change significantly during tumor progression. In contrast to VEGF, the level of expression of IL6 mRNA in the NK/Ly cells, was rather low at the initial stages and markedly increased (up to 5-fold) at the terminal stages of tumor growth. The obtained data were confirmed by ELISA analysis, which showed 4-fold increase in IL-6 concentration in the ascitic fluid at late stages of NK/Ly tumor growth (90 pg/ml and 570 pg/ml, correspondingly). In contrast to IL-6, the level of IFN- $\gamma$  in the ascitic fluid was very high at first stages of ascites (1.200 pg/ml), and then markedly (up to 30-fold) lowered at terminal ones (30 pg/ml).

Chemotherapy with Dx and Vinc resulted in diminishing IL-6 level in ascites, and in increasing IFN- $\gamma$  expression at late stages of tumor growth. This phenomenon also positively correlated with an increase in mean time of life in tumor-bearing animals.

We suggest that IL-6 is the major factor of cachexia progression, which predetermines development of inflammatory processes and possible resistance of tumor cells to chemotherapy. High level of VEGF production can serve as marker of lymphoma progression. Rapid increase in IFN- $\gamma$  expression at early stages of tumor growth, and its dramatic decrease at late stages can specify the level of immunological status of the organism and serve as a viability marker in tumor-bearing animals.