

Н.А. Володько  
 О.О. Олексяк  
 В.А. Баріака  
 В.А. Піддубняк  
 Б.Т. Білинський

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

**Ключові слова:** рак яєчника, хіміотерапія, цисплатин, мононуклеарні клітини периферичної крові, перитонеальні макрофаги, природна цитотоксичність, фактор некрозу пухлин.

## РІВЕНЬ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИН І ПРИРОДНА ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ У ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА

**Резюме.** Проведено дослідження природної цитотоксичності мононуклеарних клітин периферичної крові та перитонеальних (або асцитасоційованих) макрофагів, вмісту фактора некрозу пухлин (ФНП) в плазмі крові, в асцитичній рідині та в середовищі інкубації мононуклеарних клітин, виділених із периферичної крові, асцитичної рідини або перитонеальних змивів, у 49 хворих на рак яєчника (РЯ) та 16 пацієнток з фіброміомами матки або доброякісними кістами яєчника. Проаналізовано зміну вивчених показників після 3–4 циклів доопераційної хіміотерапії за схемою СР. Встановлено, що цитотоксичність макрофагів з перитонеальної порожнини у хворих на РЯ значно нижча, ніж у пацієнток з доброякісними пухлинними процесами. Природна цитотоксичність макрофагів із черевної порожнини не залежала від їх здатності до продукції ФНП *in vitro*, але обернено корелювала з концентрацією ФНП в асцитичній рідині. Цитотоксичність мононуклеарних клітин периферичної крові обернено корелювала з вмістом ФНП в супернатантах культур цих клітин та не залежала від вмісту ФНП у плазмі крові. Хіміотерапія з використанням цисплатину підвищувала природну цитотоксичність перитонеальних макрофагів.

### ВСТУП

Епітеліальний рак яєчників (РЯ) найчастіше з інших пухлин черевної порожнини поєднується з дисемінацією по очеревині та розвитком асциту. Водночас РЯ тривалий час не поширюється за межі черевної порожнини; імплантаційне метастазування переважає над лімфогенним та гематогенним. Ця особливість клінічного перебігу РЯ зумовлює необхідність поглибленого вивчення інтраперитонеального гомеостазу. Адже черевна порожнина стає плацдармом взаємодії організму і пухлини на молекулярному, клітинному, тканинному рівнях і, водночас, місцем застосування можливих терапевтичних впливів [19].

Анатомічні особливості розташування епітеліальних пухлин яєчника на поверхні органа забезпечують досить швидкий контакт ракових клітин з лімфоцитами, мезотелієм, перитонеальними макрофагами (ПМф), які донедавна вважалися основними ефекторами природної протипухлинної резистентності [1]. Відомо, що мононуклеарні фагоцити здатні до природної, індукованої, антигілозалежної цитотоксичності по відношенню до широкого спектра трансформованих клітин [1, 17, 19], є продуцентами біологічно активних речовин, які інгібують пухлинний ріст або здатні діяти тумороцидно, — супероксидних кисневих радикалів, інтерлейкіну-1 (ІЛ-1), фактора некрозу пухлин (ФНП) [4]. Експериментальні дані стали підставою для розроблення підходів до лікування хворих на рак, які б ґрунтувалися на активації макрофагальної цитотоксичності ІЛ-2, інтерфероном-γ

(ІФН-γ) і ліпополісахаридом (ЛПС) [11], інтраперитонеальному введенні ФНП [19], трансфекції *in vitro* асцитасоційованих макрофагів (ААМф) геном, який кодує ФНП, з метою підвищення їх цитотоксичного потенціалу [12]. З іншого боку, сьогодні не викликає сумніву можливість участі макрофагів у процесах стимуляції росту та метастазування пухлин. Продукти секреції макрофагів забезпечують ангиогенез у пухлині, протеоліз та деградацію екстрацелюлярного матриксу, підтримуючи таким чином прогресування пухлинного процесу [6, 25]. Секреторна та ефекторна активність мононуклеарних фагоцитів залежить від ступеня їх диференціації і зумовлена конкретним мікрооточенням. Здатність підтримувати пухлинну прогресію особливою мірою притаманна макрофагам, які інфільтрують пухлину — пухлиноасоційованим макрофагам (ПАМ). В попередніх публікаціях нами зроблена спроба проаналізувати функціональні відмінності ПАМ від інших субпопуляцій мононуклеарних фагоцитів (купферівських клітин, альвеолярних макрофагів, макрофагів шкіри) [1] та вплив тканинного мікрооточення на процес диференціації моноцитів у зрілі макрофаги. Адже саме мікрооточення печінки, легень, шкіри зумовлює особливості фенотипу та функцій зрілих макрофагів, які інфільтрують ці органи. Основна програма, яку виконує зрілий тканиноасоційований макрофаг, полягає в підтримці росту та гомеостазу відповідної тканини і забезпечується експресією певних груп генів. Для зрілих макрофагів, які диференціювалися в нормальному мікрооточенні, ракова клітина є агентом, що порушує

тканинний гомеостаз і підлягає елімінації. ПАМ, які проходять диференціацію від моноцитів до зрілих тканинних форм під впливом факторів пухлинного мікрооточення, як правило, не проявляють тумороцидних властивостей, а, навпаки, сприяють росту пухлини. Макрофаги, отримані зі злоякісної асцитичної рідини, займають в цьому ряді проміжну позицію. З одного боку, вони диференціювались не в пухлинній тканині, а в черевній порожнині, з іншого — зазнають впливу розчинних факторів пухлинного мікрооточення та продукують медіатори і цитокіни реактивної відповіді на пухлинний ріст. На ріст пухлини, зокрема РЯ, цитокіни, наявні в асцитичній рідині, можуть справляти як інгібуючу (ТФРβ), так і стимулювальну дію (ФРФβ, ІФР, ІЛ-1) або мати дуалістичний ефект (ЕФР, ФНП) [23]. За даними дослідження ФНП встановлено широкий спектр його біологічних функцій: медіатора імунної відповіді при бактеріальних, паразитарних, вірусних інфекціях [4]; одного з основних медіаторів, який поряд з вільними радикалами кисню та набором протеаз забезпечує природну цитотоксичність мононуклеарних фагоцитів [1]; фактора пухлинної кахексії [21]; фактора пухлинної інвазії та метастазування, проліферації та ангиогенезу, ендогенного пухлинного промотора [2, 16, 25].

З огляду на неоднозначність ролі ААМф та продукованого ними ФНП у пухлинному процесі, нами проведено дослідження, спрямоване на вивчення зв'язку між природною цитотоксичністю ААМф або ПМф та їх здатністю продукувати *in vitro* ФНП; порівняння рівня продукції ФНП ААМф (ПМф) з рівнем цього цитокіну в асцитичній рідині і плазмі крові хворих на РЯ; оцінки природної цитотоксичності мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК) та рівня продукції ними *in vitro* ФНП у хворих на РЯ; співставлення результатів спостережень з аналогічними даними, одержаними в дослідженнях з залученням пацієнток з неонкологічними захворюваннями; вивчення динаміки продукції ФНП та природної цитотоксичності ААМф (ПМф) і МКПК після проведення хіміотерапії (ХТ).

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідження були залучені 65 жінок: 49 — хворих на РЯ та 16 — з доброякісними (фіброаденома матки або доброякісна кіста яєчника) пухлинами (ДП). Обстежені до початку будь-якого спеціального лікування 25 хворих, у яких РЯ діагностовано первинно, 24 — після 3–4 циклів доопераційної ХТ за схемою СР (цисплатин по 75 мг на 1 м<sup>2</sup>, циклофосфамід — 750 мг на 1 м<sup>2</sup>), 8 з них — після ХТ в системно-регіонарному режимі (1/2 дози введено внутрішньовенно, 1/2 — інтраперитонеально). Вік первинних хворих на РЯ в середньому становив 56,2 року (від 36 до 75 років), яким проводили ХТ — 55,5 року (від 36 до 69 років); пацієнток з неонкологічними захворюваннями — 50,4 року (від 32 до 75 років). Переважним гістотипом раку були серозні папілярні аденокарциноми; у 2 випадках виявлені муцинозні адено-

карциноми; в 1 — недиференційована і в 1 — світлоклітинна карцинома. Стадію раку визначали за TNM та FIGO класифікаціями [8]. Майже у всіх пацієнток діагностовано РЯ III стадії, в однієї — IV стадії. Обстежувані пацієнтки не мали клінічних проявів запальних процесів або імунологічних порушень. Всі хворі лікувалися у Львівському регіональному онкологічному центрі протягом 1995–1999 рр.

Матеріалом для дослідження були: ПМф, ААМф, МКПК, кондиціоновані середовища їх добових культур, а також асцитична рідина і плазма крові хворих.

ААМф(ПМф) виділяли з асцитичної рідини або з перитонеальних змивів. Асцитичну рідину отримували під час лапаротомії або лапароцентезу. Перитонеальні змиви брали під час лапаротомії, використовуючи стерильний підігрітий фізіологічний розчин натрію хлориду з гепарином. Зразки асцитичної рідини або перитонеального змиву центрифугували протягом 10 хв при 1000 об/хв. Безклітинний надосад асцитичної рідини збирали і зберігали при температурі –30 °С. З ресуспендованих у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) з рН 7,2 клітинних осадів виділяли ААМф (або ПМф) шляхом центрифугування на градієнті густини фікол-верографіну ( $\rho = 1,077$ ) при 1500 об/хв протягом 20 хв. Клітинну суспензію, зібрану на межі фаз, відмивали у ФСБ та інкубували у пластикових чашках Петрі в повному середовищі RPMI 1640 протягом 1 год. Клітини, що не прилипли, відмивали свіжим теплим середовищем RPMI 1640, а налипли мононуклеари знімали гумовою паличкою і суспендували в цьому ж середовищі. Життєздатність клітин оцінювали із застосуванням 0,1% водного розчину трипанового синього. Кількість живих клітин у зразках, які використовували в роботі, перевищувала 90%. ААМф(ПМф) в концентрації  $5 \cdot 10^5$ /мл висівали у пластикову чашку діаметром 5 см («Costar», Німеччина), додаючи до середовища RPMI 1640 50 мкг/мл гентаміцину сульфату, та інкубували протягом 24 год при температурі 37 °С в атмосфері 5% CO<sub>2</sub>. Після закінчення інкубації кондиціоновані середовища центрифугували протягом 7 хв при 1000 об/хв. Надосадову рідину зберігали при температурі –30 °С.

Периферичну кров об'ємом 10 мл отримували шляхом венепункції до початку ХТ або перед оперативним втручанням. Гепаринізовану плазму об'ємом 2,5–3 мл зберігали при температурі –30 °С. МКПК одержували центрифугуванням протягом 30 хв при 1500 об/хв на градієнті густини фікол-верографіну ( $\rho = 1,077$ ). Після відмивання у ФСБ клітини ресуспендували в середовищі RPMI 1640, яке містило 50 мкг/мл гентаміцину сульфату. Подальша робота з клітинами, умови отримання супернатанту їх добових культур і його зберігання аналогічні описаним вище.

При дослідженні природної цитотоксичності як клітини-мішені використовували клітини суспензійної культури К-562 на 2–3-й день після пересівання, мічені за стандартною методикою <sup>3</sup>H-метилтимідином («Amersham», Англія). Культивували клітини К-562 у

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

повному середовищі RPMI 1640, що містило 10% ТЕС, 40 мкг/мл гентаміцину сульфату, 25 ммоль НЕРЕС.

Реакцію цитолізу *in vitro* проводили при співвідношенні кількості ефektorів і мішеней 20 : 1, протягом 18 год в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> при температурі 37 °С в триплетах. Для визначення спонтанного лізису клітин-мішеней їх інкубували в аналогічних умовах у повному середовищі RPMI 1640. Тотальний вихід мітки здійснювали шляхом додавання до клітин К-562 стандартного лізуючого розчину з рН 7,4. Результати реакції оцінювали за виходом мітки в культуральну рідину дослідних і проб, використовуючи прилад БЕТА-2. Індекси цитотоксичності (ІЦ) розраховували за стандартною формулою.

Визначення вмісту ФНП у плазмі крові, асцитичній рідині та супернатантах ААМф, ПМф і МКПК проводили за описаною раніше методикою [3].

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою критерію Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показники природної цитотоксичності ААМф (ПМф) становили від 8,9 до 44,4%. Лише у 7 із 25 хворих на РЯ ІЦ перевищували 25%, середній ІЦ в цій групі становив  $25,8 \pm 2,4\%$ . У хворих з ДП яєчника та матки цитотоксичність ПМф була дещо вищою: у 9 із 16 ІЦ понад 25%, середній ІЦ в групі —  $31,9 \pm 2,2\%$  ( $0,05 < p < 0,1$ ).

Коливання ІЦ МКПК були меншими: від 9,4 до 33,6%, в середньому у хворих на РЯ —  $21,0 \pm 1,9\%$ , з ДП —  $21,2 \pm 2,9\%$ .

Рівень ФНП в асцитичній рідині у хворих на РЯ складав  $0,35 \pm 0,08$  нг/мл, у плазмі крові —  $0,22 \pm 0,03$  нг/мл ( $p > 0,1$ ). У більшості випадків вміст ФНП в асцитичній рідині був вищим, ніж у гомологічній плазмі.

За результатами аналізу зв'язку між природною цитотоксичністю ААМф (ПМф) та рівнем ФНП в асцитичній рідині виявилось, що ІЦ  $< 25\%$  асоціюється з відносно високим рівнем ФНП (від 0,1 до 0,8 нг/мл, в середньому —  $0,36 \pm 0,07$  нг/мл). Цитотоксичність ААМф (ПМф) понад 25% визначали переважно у хворих з низьким рівнем ФНП в асцитичній рідині (менше 0,05 нг/мл) (рис. 1). Водночас, різниці рівня ФНП у супернатантах добових культур ААМф (ПМф) з високою та низькою природною цитотоксичністю не виявлено. В супернатантах культур ААМф (ПМф) з ІЦ  $> 25\%$  рівень ФНП становив  $0,24 \pm 0,05$  нг/мл, в супернатантах культур клітин з ІЦ  $< 25\%$  —  $0,23 \pm 0,04$  нг/мл.

Відомо, що природна цитотоксичність МКПК зумовлена відповідними функціями моноцитів та природних кілерів. Складається враження, що в реалізації їх цитотоксичного впливу на клітини К-562 ФНП не відіграє провідної ролі, оскільки рівень його продукції в культурах МКПК також обернено корелював з їх цитотоксичністю: при низькому ІЦ (від 9,4 до 20,7%, в середньому —  $15,5 \pm 1,4\%$ ) вміст ФНП в супернатантах добових культур перевищу-

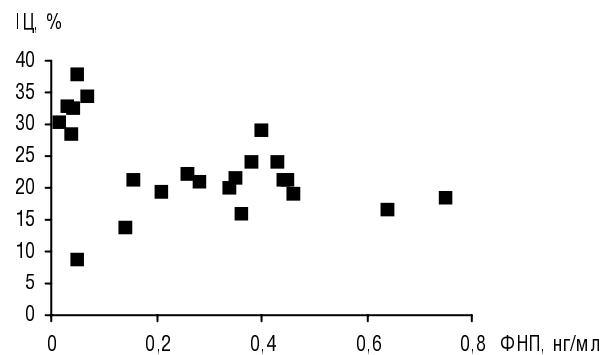


Рис. 1. Зв'язок природної цитотоксичності ААМф (ПМф) і рівня ФНП в асцитичній рідині у нелікованих хворих на РЯ

вав 0,25 нг/мл, а при ІЦ понад 21% (від 21,5 до 33,6%, в середньому —  $27,4 \pm 1,8\%$ ,  $p < 0,05$ ) рівень ФНП був, як правило, нижчим від 0,1 нг/мл (рис. 2). Слід також зазначити, що зв'язку між рівнем ФНП у плазмі крові та природною цитотоксичністю МКПК в жодній з обстежених груп хворих не виявлено.

Проведення системної ХТ мало клінічний ефект щодо зменшення обсягу пухлин, що створювало кращі умови для подальшого оперативного лікування, та впливало на цитотоксичність ААМф (ПМф): середнє значення ІЦ цих клітин підвищувалося до  $32,5 \pm 1,9\%$  ( $p < 0,05$ ). Спостерігали також тенденцію до підвищення цитотоксичності МКПК (ІЦ  $28,5 \pm 3,4\%$ ). Зберігалася обернена залежність між цитотоксичністю МКПК та ФНП-продукуючою активністю цих клітин. При ІЦ МКПК менше від 13% концентрація ФНП в супернатантах була вищою ( $0,16 \pm 0,03$  нг/мл), а при високій цитотоксичності цих клітин (ІЦ  $> 30\%$ ) рівень ФНП становив  $0,08 \pm 0,03$  нг/мл. Вміст ФНП у плазмі крові після проведення ХТ мав тенденцію до підвищення:  $0,36 \pm 0,07$  нг/мл, а в асцитичній рідині — до

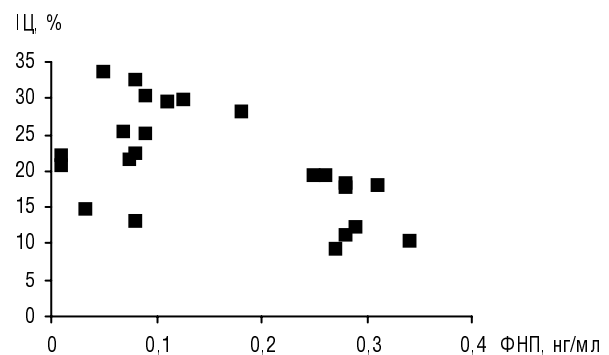


Рис. 2. Зв'язок природної цитотоксичності МКПК і концентрації ФНП в супернатанті культури МКПК у нелікованих хворих на РЯ

зниження:  $0,18 \pm 0,03$  нг/мл. ФНП-продукуюча активність ААМф (ПМф) *in vitro* не змінювалась, вміст цього цитокіну у відповідних супернатантах становив  $0,28 \pm 0,08$  нг/мл.

Зміни інтраперитонеального гомеостазу у хворих, яким проводили ХТ в системно-регіонарному режимі, мали певні особливості. Лікування, як правило, сприяло зникненню або зменшенню об'єму асцитичної рідини. Тому ААМф (ПМф) переважно отримували

методом змиву. Їх цитотоксичність виявилася вищою, ніж у нелікованих хворих (ІЦ  $35,7 \pm 2,1\%$ ,  $p < 0,05$ ), але не відрізнялася від цитотоксичності ААМф (ПМф) у хворих, яким проводили системну ХТ. Водночас рівень ФНП у супернатанті ААМф (ПМф) підвищувався ( $0,35 \pm 0,03$  нг/мл,  $p < 0,05$ ).

Отже, визначено зниження цитотоксичності ААМф (ПМф) у хворих на РЯ III стадії порівняно з аналогічними показниками у хворих з ДП яєчника та матки. Зниження цитотоксичності ПМф на фоні імплантаційного розповсюдження ракових клітин по очеревині виявлено й іншими авторами під час як експериментальних [6], так і клінічних досліджень [19, 20]. На нашу думку, за рівнем тумороцидного потенціалу ААМф наближається до ПАМ, для яких низька цитотоксичність є однією з характерних ознак [1].

Виявлення нами активації цитотоксичності ААМф у відповідь на ХТ було дещо несподіваним, оскільки, як правило, ХТ пригнічує більшість імунологічних показників. Водночас можливість активації ПМф, за допомогою цисплатину видається перспективною. Посилення цитотоксичності цих клітин розроблялося як один із стратегічних напрямків імунотерапії раку. Було показано, що ІФН- $\gamma$  посилює цитотоксичний ефект моноцитів [13]. Доведено, що для подальшого посилення цитотоксичної дії на пухлинні клітини необхідний контакт макрофагів з ІФН- $\gamma$  та ЛПС [10], а максимальну активацію відзначають при об'єднанні ІФН- $\gamma$ /ЛПС з ІЛ-2 [11]. Встановлено також, що під впливом комбінованого застосування сизофірану та ІФН- $\gamma$  збільшується кількість ПМф, зростає число і видовження їх псевдоподій, посилюється продукція ІЛ-1 $\beta$ , ІФН- $\gamma$ , ФНП [7]. На жаль, клінічне використання ІФН та ЛПС не дало бажаного ефекту [5], а застосування схеми активації ПМф, запропонованої авторами дослідження [11], обмежене через наявність системної токсичності її складових. Механізм впливу цисплатину на активність ПМф не визначений. Можливо, під час ХТ індукується ендогенна секреція одного або кількох стимулюючих цитокінів. Але найбільш ймовірним виглядає припущення, що зафіксований нами феномен пов'язаний з циторедуктивним ефектом цисплатину, внаслідок якого зменшується вплив на ПМф розчинних біологічно активних факторів пухлини. Останні, як відомо, можуть пригнічувати тумороцидні функції макрофагів [9] та індукувати секрецію макрофагальних цитокінів (зокрема, ФНП), які можуть стимулювати ангиогенез, пухлинну прогресію та метастазування. В цьому контексті доцільно підкреслити, що активація секреції ФНП макрофагами, які перебувають у контакті із пухлинними клітинами, певною мірою залежить від обсягу пухлинної маси. Так, дані наших досліджень свідчать, що за наявності поширеного РЯ рівень секреції ФНП макрофагами черевної порожнини у 2,5 разу вищий, ніж у пацієнтів з пухлиною, що локалізується у межах таза [22].

Нами відзначено обернену кореляцію між природною цитотоксичністю мононуклеарів крові та їх

ФНП-продукуючою активністю *in vitro*, що співпадає з повідомленнями інших дослідників [15]. Зв'язок між цитотоксичністю МКПК та рівнем ФНП у плазмі крові не встановлено. Одночасно виявляють обернену залежність природної цитотоксичності ПМф і рівня ФНП в асцитичній рідині. Нами також виявлено вищий вміст ФНП в асцитичній рідині, ніж у плазмі крові хворих на РЯ. Це узгоджується з даними інших дослідників, згідно з якими в асцитичній рідині у хворих на РЯ рівень ФНП значно вищий, ніж у перитонеальній рідині у здорових осіб [14, 18, 22, 26], ФНП у хворих на РЯ продукується не тільки імунокомпетентними клітинами та мезотелієм, а й у багатьох випадках пухлиною [22, 24]. Крім ФНП, багатьма дослідниками виявлені в асцитичній рідині у хворих на РЯ підвищені рівні ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-12, ТФР- $\beta$  та інших цитокінів [14, 26]. Вочевидь, пухлина продуктами своєї паракринної активності, нагромадженими в асцитичній рідині, інгібує цитотоксичність макрофагів. Все викладене викликає серйозні сумніви стосовно доречності використання, зокрема інтраперитонеального введення, ФНП з лікувальною метою.

Отже, хоча ФНП властива протипухлинна дія, здатність РЯ успішно розвиватися при високому вмісті ФНП в асцитичній рідині та пухлинному мікросередовищі наводить на думку, що сама пухлина або використовує сигнал цього цитокіну як проліферативний, або захищається від індукованого ним апоптозу, наприклад, внаслідок експресії білків термічного шоку, які захищають клітини від індукованого ФНП апоптозу шляхом підвищення рівня глутатіону та зниження рівня перекисних радикалів [16].

Нарешті слід зазначити, що встановлена нами відсутність зв'язку між цитотоксичністю ААМф до клітин K-562 та їх ФНП-продукуючою активністю суперечить даним про прямий цитотоксичний ефект ФНП, а також інформації, що ФНП поряд з безпосередньою дією на клітини-мішені сприяє підвищенню цитотоксичної активності природних талімфокінактивованих кілерів, макрофагів. У серії експериментів виявлено зростання цитотоксичної активності ПМф щодо клітин лінії U937 після інтраперитонеального введення ФНП (TNF $\alpha$ ) [19], а також доведено підвищення цитотоксичної активності ААМф після трансфекції геном, що кодує ФНП [12]. Однак результати нашого дослідження не дають підстав твердити про такий активуючий вплив ФНП. Можливо також, що лінія K-562 не належить до чутливих до дії цього цитокіну.

## ВИСНОВКИ

1. Цитотоксичність макрофагів, отриманих з перитонеальної порожнини у хворих на РЯ, істотно нижча, ніж у пацієток з доброякісними кістами яєчників та фіброміомами матки; виявлено обернену залежність між природною цитотоксичністю ААМф (ПМф) хворих на РЯ та рівнем ФНП в асцитичній рідині.

2. Застосування протипухлинної ХТ сприяє відновленню і навіть підвищенню природної цитоток-

сичності ПМф завдяки зменшенню впливу факторів пухлинного мікродовкілля на інтраперитонеальний гомеостаз. Цій ефект не залежить від способу введення протипухлинного препарату.

3. Системне введення цисплатину не впливає на ФНП-продукуючу активність ААМф (ПМф); інтраперитонеальне застосування препарату супроводжується вірогідним підвищенням продукції ФНП ПМф.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Билынский БТ, Володько НА, Шпарык ЯВ. Иммунологические механизмы естественной противоопухолевой резистентности. Киев: Наук думка, 1991. 248 с.
2. Кудрявец ЮИ. Усиление образования опухолевых узлов в легких мышей под влиянием фактора некроза опухолей. Эксперим онкол 1998; **20**: 114–8.
3. Матлан ВЛ, Володько НА, Барилка ВА та ін. Продукція фактора некрозу пухлин при лімфопроліферативних захворюваннях: взаємодія пухлини та організму. Онкологія 2000; **2**: 167–71.
4. Aggarwal BB, Vilecek J. Tumor necrosis factor: structure, function and mechanism of action. New York: Marcel Dekker, 1992. 624 p.
5. Andreesen R, Henneman B, Krause SW. Adoptive immunotherapy of cancer using monocyte-derived macrophages rationale, current status and perspectives. J Leukocyt Biol 1998; **64**: 419–26.
6. Barth MW, Morahan PS. Role macrophages in the host response to Lewis lung peritoneal carcinomatosis. Cancer Immunol Immunother 1994; **38**: 233–42.
7. Chen JT, Hasumi K. Activation of peritoneal macrophages in patients with gynecological malignancies by sizofiran and recombinant interferon-gamma. Biother 1993; **6**: 189–94.
8. Coleman RL, Miller DS. Topotecan in the treatment of gynecologic cancer. Semin Oncol 1997; **44**: S20–S5–S20–63.
9. Elger KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophages connection. J Leukoc Biol 1998; **64**: 275–90.
10. Hamilton TA, Janssen MM, Somers SD, et al. Effects of bacterial lipopolysaccharide on protein synthesis in murine peritoneal macrophages: relationship to activation for macrophage tumoricidal function. J Cell Physiol 1986; **325**: 262–5.
11. Han X, Wildbanks GD, Devaja O, et al. IL-2 enhances standard IFNg/LPC activation of macrophage cytotoxicity to human ovarian carcinoma *in vitro*: a potential for adoptive cellular immunotherapy. Gynecol Oncol 1999; **75**: 198–210.
12. Itoh Y, Koshita Y, Takahashi M, et al. Characterization of tumor necrosis factor-gene-transduced tumor-infiltrating lymphocytes from ascitic fluid of cancer patients: analysis of cytolytic activity, growth rate, adhesion molecule expression and cytokine production. Cancer Immunol Immunother 1995; **40**: 95–102.
13. Jett JR, Mantovani A, Herberman RB. Augmentation of human monocyte-mediated cytotoxicity by interferon. Cell Immunol 1980; **54**: 425–34.
14. Moradi MM, Carson LF, Weinberg B, et al. Serum and ascitic fluid levels of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in patients with ovarian epithelial cancer. Cancer 1993; **72**: 2433–40.
15. Mysliwska J, Bryl E, Zorena K, et al. Overactivity of tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-6 is associated with low natural killer cytotoxic activity in the elderly. Gerontol 1997; **43**: 158–67.
16. Orosz P, Echtenacher B, Falk W, et al. Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. J Exp Med 1993; **177**: 1391–8.
17. Powell CB, Scott JH, Collins JL. Comparison of TNFalpha and TNFbeta cytolytic mechanisms in human ovarian and cervical carcinoma cell lines. Gynecol Oncol 1998; **71**: 258–65.
18. Punnonen R, Teisala K, Kuoppala T, et al. Cytokine production profiles in the peritoneal fluids of patients with malignant or benign gynecologic tumors. Cancer 1998; **83**: 788–96.

19. Richters CD, van de Loosdrecht AA, van Rijswijk RE, et al. The cellular composition in the peritoneal cavity and the cytotoxic function of the peritoneal cells from patients with ovarian cancer; effect of tumor necrosis factor-alpha treatment. Cancer Lett 1993; **68**: 25–31.

20. Schoudorf T, Engel H, Lindemann C, et al. Cellular characteristics of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gynaecological tumors. Cancer Immunol Immunother 1997; **44**: 88–96.

21. Sueoka N, Sueoka E, Okabe S, et al. Anti-cancer effects of morphine through inhibition of tumor necrosis factor-alpha release and mRNA expression. Carcinogenesis 1998; **17**: 2337–41.

22. Volodko N, Oleksyak O, Barylka V, et al. Activity of tumor and host cells in human ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer 1999; **9** (S1): 23–4.

23. Westermann AM, Beijnen JH, Moolenaar WH and Rodenhuis S. Growth factors in human ovarian cancer [Review]. Cancer Treatm Reviews 1997; **23**: 113–31.

24. Wu CM, Boyer RS, Whitaker A, et al. Tumor necrosis factor as an autocrine and paracrine growth factors for ovarian cancer: monocine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. Cancer Res 1993; **53**: 1939–44.

25. Yoshida S, Ono M, Shomo T, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor-dependent angiogenesis. Molec & Cell Biol 1997; **17** (7): 4015–23.

26. Zeimet AG, Widschwendter M, Knabbe C, et al. Ascitic interleukin-12 is an independent prognostic factor in ovarian cancer. J Clin Oncol 1998; **16** (5): 1861–8.

## THE LEVELS OF TUMOR NECROSIS FACTOR AND NATURAL CYTOTOXICITY OF PERITONEAL MACROPHAGES IN OVARIAN CANCER PATIENTS

N.A. Volodko, O.O. Oleksyak, V.A. Barylka, V.A. Piddubnyak, B.T. Bilynsky

**Summary.** Investigation was carried out to define the level of natural cytotoxicity of mononuclear cells from peripheral blood and peritoneal (or ascites-associated) macrophages and the content of tumor necrosis factor in the plasma, ascitic fluid, and incubation medium of mononuclear cells from the peripheral blood, ascitic fluid, and peritoneal lavage fluid of 49 patients with ovarian cancer (OC) and 16 patients with uterine fibroma or benign ovarian cysts. Changes were analyzed occurring in the above-mentioned indicators after 3 or 4 cycles of cisplatin-based pre-operation chemotherapy. It is established that the cytotoxicity level of macrophages from the peritoneum is much lower in OC patients than in patients with benign processes. The nature of macrophages' cytotoxicity from the peritoneum showed no dependence on their capacity of producing TNF *in vitro* but depended inversely on the level of TNF in ascites. The level of cytotoxicity of mononuclear cells from peripheral blood depended inversely on the TNF levels in supernatants of mononuclear cell cultures and did not depend on the TNF level in the blood plasma. Cisplatin-based chemotherapy increased the level of natural cytotoxicity of peritoneal macrophages.

**Key Words:** ovarian cancer, chemotherapy, cisplatin, mononuclear cells of peripheral blood, peritoneal macrophages, natural cytotoxicity, tumor necrosis factor