

Литература

1. Zelen M. The randomization and stratification of patients to clinical trials. *J Chron Dis* — 1974;27:365—75.
2. Kalbfleisch J.D., Prentice R.L. The statistical analysis of failure time data. New York: John Wiley & Sons, 1980.
3. Gray R.J. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat* — 1988; 16:1141—54.
4. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Stat Assoc* — 1958;53:457—81.
5. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chem Rep* — 1966; 50:163—70.
6. Cox D.R. Regression models and life tables. *J R Stat Soc Series B* — 1972;34:187—229.
7. Pilepich M.V., Caplan R., Byhardt R.W. et al. Phase in trial of androgen suppression using goserelin in unfavorable prognosis carcinoma of the prostate treated with definitive radiotherapy: Report of Radiation Therapy Oncology Group protocol 85—31. *J Clin Oncol* — 1997;15:1013—21.
8. Pilepich M.V., Winter K., John M.J. et al. Phase in RTOG trial 86-10 of androgen deprivation adjuvant to definitive radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* — 2001;50:1243—52.
9. Bolla M., Gonzalez D., Warde P. et al. Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin. *N Engl J Med* — 1997;337:295—300.
10. Bolla M., Collette L., Blank L. et al. Long term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): A phase IE randomized trial. *Lancet* — 2002; 360:103—8.
11. Lawton C.A., Winter K., Murray K. et al. Updated results of the phase in RTOG trial 85-31: Evaluating the potential benefit of androgen suppression following standard radiation therapy for unfavorable prognosis carcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* — 2001;49:937—46.
12. Pilepich M.F., Krall J.M., Sarraf M. et al. Androgen deprivation with radiation therapy compared with radiation therapy alone for locally advanced prostatic carcinoma: A randomized comparative trial of the Radiation Therapy Oncology Group. *Urology* — 1995;45:616—23.
13. Laverdiere J., Gomez J.L., Cusan L. et al. Beneficial effect of combination hormonal therapy administered prior and following external beam radiation therapy in localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* — 1997;37:247—52.
14. Hanks G.E., Pajak T.F., Porter A. et al. Phase in trial of longterm adjuvant androgen deprivation after neoadjuvant hormonal cytotoreduction and radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate: The Radiation Therapy Oncology Group protocol 92-02. *J Clin Oncol* — 2003;21: 3972—8.
15. Stege R. Potential side-effects of endocrine treatment of long duration in prostate cancer. *Prostate Suppl* — 2000;10:38—42.
16. Berruti A., Dogliotti L., Terrone C. et al. Changes in bone mineral density, lean body mass and fat content as measured by dual energy x-ray absorptiometry in patients with cancer without apparent bone metastases given androgen deprivation therapy. *J Urol* — 2002; 167:2361—67.
17. Ross R.W., Small E.J. Osteoporosis in men treated with androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Urol* — 2002;167:1952—56.

Экспрессия интерлейкина-6 человека и его вирусного гомолога в ткани рака предстательной железы

Е.И. Велиев¹, А.В. Рыбальченко¹, Д.А. Широков², Н.Н. Тупицын²

¹Кафедра урологии и хирургической андрологии РМАПО;

²Лаборатория иммунологии гемопоэза ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН

EXPRESSION OF HUMAN INTERLEUKIN-6 AND ITS VIRAL HOMOLOGUE IN PROSTATE CANCER TISSUE

Ye.I. Veliyev¹, A.V. Rybalchenko¹, D.A. Shirokov², N.N. Tupitsyn²

¹Department of Urology and Surgical Andrology, Russian Medical Academy of Postgraduate Education;

²Laboratory of Immunology of Hemopoiesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences

Human interleukin-6 (IL-6) is of considerable importance in the pathogenesis of prostate cancer (PC). Prostatic cells are also known to be a reservoir for human herpesvirus 8 type (HHV-8). Due to the findings that HHV-8 had a homologue of human IL-6, viral IL-6, it seemed interesting to study the expression of these two cytokines in the tumor tissue of patients with PC. The expression of IL-6 mRNA was found in 70% of the patients. That of viral IL-6 was not detected in this disease. Nevertheless, a genetic HHV-8 material was ascertained in the tumor tissue of 2 patients with PC.

Патогенетическая роль интерлейкина-6 (ИЛ-6) при раке предстательной железы (РПЖ) широко обсуждается в литературе. Первоначально экспрессия ИЛ-6 и рецептора для данного цитокина была установлена на модели клеточных линий РПЖ [1]. Впоследствии доказано, что рецептор ИЛ-6 представлен в 78% случаев доброкачественной гиперплазии предстательной железы и в 100% случаев РПЖ [2]. В линии клеток, происходящей из нормального эпителия предстательной железы (PZ-HPV-7), цитокины семейства ИЛ-6 (ИЛ-6, лейкоингибирующий фактор, онкостатин М) не экспрессируются. ИЛ-6

способен индуцировать нейроэндокринную дифференцировку [3]. Доказано, что по мере прогрессии данной опухоли появляется экспрессия рецептора ИЛ-6 (gp80), и опухолевые клетки приобретают способность секретировать данный цитокин, что является одним из механизмов аутокринной регуляции роста аденокарциномы. Важная патогенетическая роль ИЛ-6 при РПЖ состоит в том, что он вызывает независимую от лигандов активацию рецептора андрогенов на опухолевых клетках [4]. Повышенные уровни сывороточного ИЛ-6 коррелируют с прогрессией андрогеннезависимого РПЖ [5].

В последние годы открыт новый цитокин семейства ИЛ-6 — вирусный ИЛ-6, который закодирован в геноме вируса герпеса 8 типа человека (HHV-8). Интересно отметить, что одним из резервуаров HHV-8 в организме человека является предстательная железа. Выполненные с помощью гибридизации *in situ* исследования показали, что в железистом эпителии простаты лиц из эндемичных по HHV-8 регионов могут быть экспрессированы некоторые гены латентной инфекции HHV-8 [6]. Маркеры HHV-8 — вирусспецифические антитела и/или нуклеотидные последовательности вируса — были обнаружены в сыворотке крови и эякулятах значительного числа пациентов с различной патологией простаты [7]. О возможной роли HHV-8 в патогенезе РПЖ свидетельствует тот факт, что уровни антител к HHV-8 у больных РПЖ достоверно выше, чем у здоровых [8].

В работе представлены результаты исследования экспрессии человеческого и вирусного ИЛ-6 в ткани РПЖ. Особое внимание уделено генетическому подтверждению наличия последовательностей HHV-8 в образцах удаленных опухолей.

Материалы и методы

Исследование проведено у 17 больных РПЖ в возрасте 54—71 года. Во всех случаях диагноз аденокарциномы предстательной железы был верифицирован гистологически на основании исследования биопсийного материала.

Таблица 1. Результаты ОТ-ПЦР с РНК, выделенной из образцов РПЖ

Пациент	Экспрессия мРНК hIL-6	Экспрессия мРНК vIL-6	β-globin
ВИ	—	—	+
ТБ	+	—	+
МИ	+	—	+
ТК	—	—	+
КО	+	—	+
АМ	+	—	+
МА	—	—	+
ЭЛ	+	—	+
БО	+	—	+
АТ	+	—	+

Выделение ДНК. К клеточной суспензии добавляли 0,1 % SDS по объему и разрушали мембраны клеток троекратным замораживанием/ размораживанием. После этого добавляли равный объем фенола, встряхивали содержимое пробирки на вортексе и откручивали при 13400 об/мин на центрифуге в течение 10 мин. Далее отбирали из пробирки верхнюю фазу и переносили ее в пробирку с равным объемом смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1), интенсивно встряхивали и центрифугировали при 13400 об/мин в течение 10 мин. Отбирали верхнюю фазу, добавляли к ней равный объем хлороформа и снова центрифугировали при 13400 об/мин 10 мин. Снова отбирали верхнюю фазу, переносили ее в новую пробирку и добавляли 3М ацетат натрия pH 5,0 (10% по объему) и равный объем изопропилового

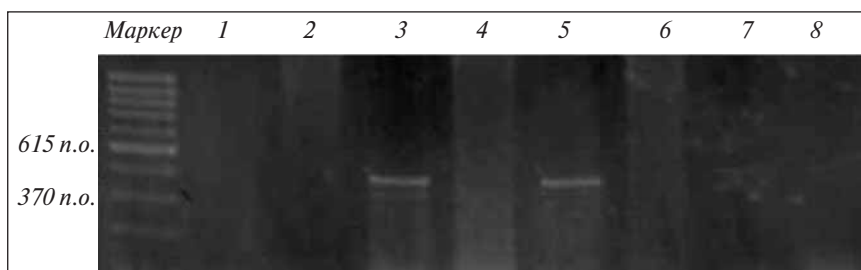


Рис. 1. Результаты ОТ-ПЦР

1—2 — κДНК больного ВИ; 3—4 — κДНК больного ТБ; 5—6 — κДНК больного МИ; 7—8 — κДНК больного ТК. Положительный сигнал на мРНК hIL-6 наблюдается у пациентов ТБ (3), МИ (5). Здесь и на рис. 2: 1, 3, 5, 7 — использовались праймеры к κДНК hIL-6; 2, 4, 6, 8 — использовались праймеры к κДНК vIL-6

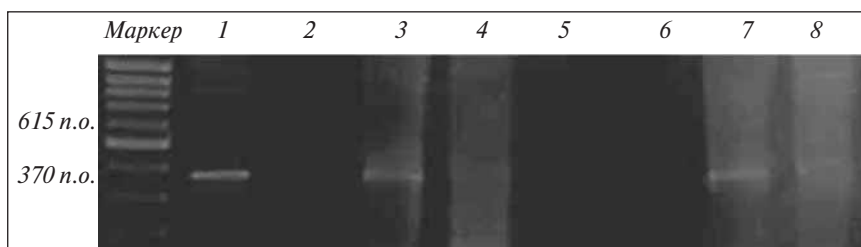


Рис. 2. Результаты ОТ-ПЦР

1—2 — κДНК больного КО; 3—4 — κДНК больного АМ; 5—6 — κДНК больного МА; 7—8 — κДНК больного ЭЛ. Положительный сигнал на мРНК hIL-6 наблюдается у пациентов КО (1), АМ (3), ЭЛ (7)

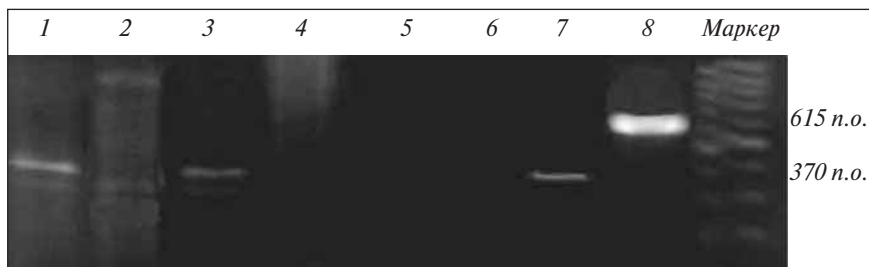


Рис. 3. Результаты ОТ-ПЦР

1—2 — κДНК больного БО; 3—4 — κДНК больного АТ; 5—6 — негативный контроль (ddH2O вместо κДНК); 7—8 — положительный контроль на мРНК hIL-6 и vIL-6 (7 — κДНК клеточной линии κ562, 8 — κДНК клеточной линии BC3). Положительный сигнал на мРНК hIL-6 наблюдается у пациентов БО (1), АТ (3)

спирта. Пробирку ставили на ночь в морозильную камеру (-20°C), после этого открывали на центрифуге при 13400 об/мин 10 мин. Осадок высушивали, а после ресуспендировали деионизованной водой.

Выделение РНК. К клеточной суспензии добавляли гуанидин-тиоционатный буфер (4М гуанидин тиоцианат, 25 мМ натрия цитрат pH 7,0, 0,5% натрия N-лауроилсаркозилат, 0,1% β -меркаптоэтанол), держали 10 мин при комнатной температуре, далее добавляли 3М ацетат натрия pH 5,0 (10% по объему), интенсивно перемешивали содержимое пробирки, добавляли равный объем фенола, 5 мин держали при комнатной температуре, далее добавляли смесь хлороформа с изоамиловым спиртом (24:1), интенсивно перемешивали и центрифугировали при 13400 об/мин в течение 10 мин, после чего отбирали верхнюю фазу, переносили ее в новую пробирку и повторяли экстракцию с фенолом и хлороформом. Отбирали водную фазу, добавляли 2,5 объема этилового спирта и ставили на ночь в морозильную камеру (-20°C), затем открывали от спирта на центрифуге при 13400 об/мин в течение 10 мин, осадок высушивали и ресуспендировали деионизованной водой.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась на амплификаторе «Терцик» (Россия). Для каждой пары праймеров использовалась индивидуальная программа. Для амплификации использовали следующие пары праймеров:

vIL-6 forward: 5'-CAGCCATATGATGTGCTG-GTTCAAGTTGTG-3', vIL-6 reverse: 5'-AGCACTC-GAGTTACTTATCGTGGACGTCAG-3'; условия амплификации: денатурация 94°C 30 с, отжиг праймеров 58°C 45 с, элонгация 72°C 45 с. Цикл повторялся 35 раз. Продукт амплификации равнялся 615 п.о.;

ORF26 forward: 5'-AGCCGAAAGGATTCCAC-CAT-3', ORF26 reverse: 5'-CTGGACGTTAGACAA-CACGGA-3'; условия амплификации: денатурация 94°C 30 с, отжиг праймеров 55°C 30 с, элонгация 72°C 30 с. Цикл повторялся 35 раз. Продукт амплификации равнялся 233 п.о.;

K1 forward: 5'-GACCTTGTGGACATCCCG-TACAATC-3', K1 reverse: 5'-AGGCCATGCTGTAAG-TAGCACGGTT-3'; условия амплификации: денатурация 94°C 1 мин, отжиг праймеров 55°C 1 мин, элонгация 72°C 2 мин. Цикл повторялся 35 раз. Продукт амплификации равнялся 1073 п.о.;

GAPDH forward 5'-AGTCCAGTGAGCTTCC-CGTTCAAGC-3', GAPDH reverse 5'-TGGTATCGTG-GAAGGACTCATGAC-3'; условия амплификации: денатурация 94°C 1 мин, отжиг праймеров 60°C 1 мин, элонгация 72°C 1 мин. Цикл повторяли 40 раз. Продукт амплификации равнялся 190 п.о.;

hIL-6 forward: 5'-CCTGAACCTTCCAAAGATGG-3', hIL-6 reverse: 5'-CATTTGCCGAAGAGCCCTCA-3' (продукт амплификации равнялся 370 п.о.); условия

амплификации: денатурация 94°C 45 с, отжиг праймеров 60°C , элонгация 72°C 30 с. Цикл повторяли 30 раз;

β -globin forward: 5'-CTGGGCAGGCTGCTG-GTG-3', β -globin reverse: 5'-GCTTGTACAGT-GCAGCTC-3' (продукт амплификации равнялся 210 п.о.); условия амплификации: денатурация 94°C 45 с, отжиг праймеров 60°C , элонгация 72°C 30 с. Цикл повторяли 30 раз. Для разделения ПЦР-амплифицированных фрагментов использовали 1,7% легкоплавкую агарозу на 1x TBE-буфере, содержащую бромистый этидий.

Обратная транскрипция (ОТ). Реакцию проводили стандартно в объеме 40 мкл. К 20 мкл РНК добавляли 2 мкл политимидинового олигонуклеотида (18 звеньев). После этого ставили пробирку в термостат ($+70^{\circ}\text{C}$) на 5 мин. Далее добавляли 8 мкл 5x буфера для ОТ, 4 мкл смеси дезоксирибонуклеотидов, 4 мкл ингибитора рибонуклеазы и ставили пробирку в термостат ($+37^{\circ}\text{C}$) на 5 мин. После добавляли 2 мкл фермента MMuLV обратной транскриптазы и ставили пробирку в термостат (42°C) на 1 ч. Фермент инактивировали 10 мин при 70°C .

Результаты и обсуждение

Результаты одновременного изучения экспрессии человеческого и вирусного ИЛ-6 тканью РПЖ

Таблица 2. Результаты ПЦР с ДНК, выделенной из образцов РПЖ

Пациент	vIL-6	Гены HHV-8 ORF26	K1	Контроль GAPDH
КВ	—	—	—	+
КС	—	—	—	+
МК	+	+	—	+
ВИ	—	—	—	+
ТБ	—	—	—	+
ВФ	—	—	—	+
МИ	—	—	—	+
ТК	—	—	—	+
ФЯ	—	—	—	+
ЧН	+	—	—	+
БК	—	—	—	+
КО	—	—	—	+
АМ	—	—	—	+
МА	—	—	—	+
ЭЛ	—	—	—	+
БО	—	—	—	+
АТ	—	—	—	+

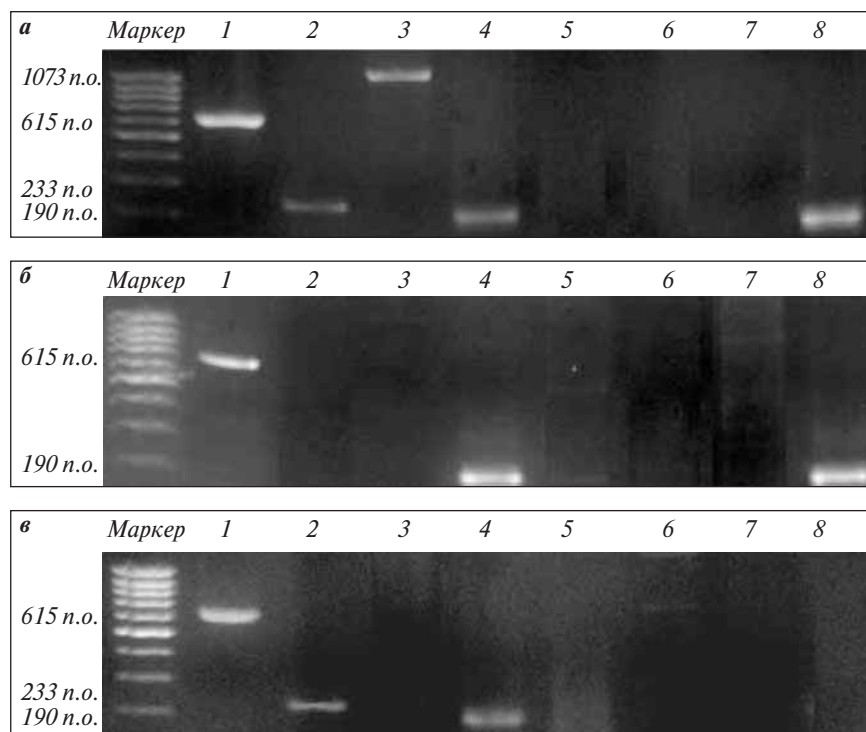


Рис. 4. Результаты ПЦР образцов РПЖ, полученных у больных КВ (а), ЧН и БК (б) и МК (в)

1, 5 — использовались праймеры к гену *vIL-6*, 2, 6 — праймеры к гену *ORF26*, 3, 7 — к гену *K1*, 4, 8 — к гену *GAPDH*.

а: 1—4 — позитивный контроль (ДНК клеточной линии ВСЗ),

5—8 — ДНК больного КВ; б: 1—4 — ДНК больного ИИ, 5—8 — ДНК больного БК;

в: 1—4 — ДНК больного МК, 5—8 — негативный контроль (*ddH2O* вместо ДНК)

представлены в табл. 1. В качестве положительного контроля изучалась мРНК -глобина (100% положительный результат).

Экспрессии вирусного ИЛ-6 не наблюдалось ни в одном из исследованных случаев. Экспрессия ИЛ-6 человека была обнаружена в 7 (70%) случаях из 10.

На рис. 1—3 представлены результаты ОТ-ПЦР, свидетельствующие о том, что даже в *hIL-6*-позитивных случаях не наблюдается следовых уровней экспрессии *vIL-6*.

Анализ на наличие последовательностей ННВ-8 дал положительный результат у 2 пациентов. У пациента МК были обнаружены ген *vIL-6* и ген

ORF26, а у пациента ЧН — только ген *vIL-6* (рис. 4, табл. 2).

Обсуждение

Полученные данные позволили ответить на 3 важных вопроса. Во-первых, подтверждена экспрессия ИЛ-6 опухолевой тканью РПЖ в 70% случаев. Это находится в полном соответствии с данными литературы, и именно в этих случаях можно предполагать аутокринную или паракринную регуляцию опухолевого роста данным цитокином. Таким образом, с учетом роли ИЛ-6 в индукции нейроэндокринной дифференцировки РПЖ и активации рецепторов для андрогенов становится возможной более точная идентификация данной группы пациентов для разработки соответствующих лечебных мероприятий.

Во-вторых, нами практически исключена какая бы то ни было патогенетическая роль вирусного гомолога ИЛ-6, закодированного в геноме ННВ-8. Ни в одном из 10 изученных случаев РПЖ экспрессии данного цитокина не отмечено.

И, наконец, возможная патогенетическая или этиологическая роль ННВ-8 в части случаев РПЖ не

исключается на основании полученных нами данных. У 2 (12%) из 17 пациентов в ткани опухоли были обнаружены нуклеотидные последовательности генома ННВ-8. Интересно отметить, что в обоих случаях (пациенты МК и ЧН) нельзя исключить интеграцию части генома ННВ-8, так как последовательности *K1* отсутствовали. У одного из пациентов в опухолевой ткани выявлен только ген вирусного ИЛ-6, а у второго — ген вирусного ИЛ-6 в сочетании с *ORF-26*. Обращает на себя внимание, что ген вирусного ИЛ-6 присутствовал у обоих больных, что теоретически не исключает возможности индукции экспрессии цитокина в опухолевых клетках.

Литература

1. Siegall C.B., Schwab G., Nordan R.P. et al. Expression of the interleukin 6 receptor and interleukin 6 in prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 1990;50(24):7786—8.
2. Siegmund M.J., Yamazaki H., Pastan I. Interleukin 6 receptor mRNA in prostate carcinomas and benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1994;151(5):1396—9.
3. Palmer J., Hertzog P.J., Hammacher A. Differential expression and effects of gp130 cytokines and receptors in prostate cancer cells. *Int J Biochem*

- 2004;36(11):2258—69.
4. Kim O., Jiang T., Xie Y. et al. Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 2004;23(10):1838—44.
5. Hammacher A., Thompson E.W., Williams E.D. Interleukin-6 is a potent inducer of S100P, which is upregulated in androgen-refractory and metastatic prostate cancer. *Int J Biochem* 2005;37(2):442—50.
6. Гурцевич В.Э. Вирус герпеса человека 8

типа (ННВ-8). В кн.: Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М., Медицина; 2004. с.314—25.

7. Гурцевич В.Э., Кадырова Е.Л., Чернова В.А. и др. Поиск резервуара для ННВ-8-ассоциированных болезней и путей распространения ННВ-8 в России. *Вопр вирусол* 2004;49(6):20—4.
8. Hoffman L.J., Bunker C.H., Pellett P.E. et al. Elevated seroprevalence of human herpesvirus 8 among men with prostate cancer. *J Infect Dis* 2004;189(1):15—20.