

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2023.02.14

Адреса для листування: Гашека 2а,
Львів, Україна, 79000

Е-пошта: nvolodko@yahoo.com,
dr.fetsych@gmail.com

Надійшла до редакції: 15.10.2023

Прийнята до друку: 31.10.2023

Опублікована: 22.12.2023

ORCID IDs

Маркіян Фецич:

<https://orcid.org/0000-0002-5375-3968>

Наталя Ігуменцева:

<https://orcid.org/0000-0002-1928-4707>

Северин Фернеза:

<https://orcid.org/0000-0002-3974-7975>

Роман Ярема:

<https://orcid.org/0000-0001-8314-7945>

Наталя Володько:

<https://orcid.org/0000-0002-4478-5554>

Конфлікт інтересів: автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Особистий внесок авторів:

Створення концепції: Наталя Володько,
Роман Ярема, Маркіян Фецич;

Результати дослідження: Наталя Володько,
Маркіян Фецич, Наталя Ігуменцева,
Северин Фернеза;

Написання: Наталя Володько, Маркіян
Фецич, Северин Фернеза;

Редагування та затвердження остаточного
варіанту: Наталя Володько, Роман
Ярема;

Дозвіл комісії з питань біоетики: дослідження було схвалено локальною етичною комісією Львівського регіонального онкоцентру.

Фінансування: автори не отримали жодної фінансової підтримки свого дослідження.



© Всі автори, 2023

Цитокін-модулюючий вплив HIPEC на формування внутрічеревного гомеостазу у пацієнток з раком яєчників

Маркіян Фецич, Наталя Ігуменцева,
Северин Фернеза, Роман Ярема, Наталя Володько

Львівський Національний Медичний Університет
імені Данила Галицького, Львів, Україна

Вступ. Рак яєчників (РЯ) залишається нозологією з найвищим рівнем смертності серед онкогінекологічних захворювань. Більшість випадків діагностується на етапі перитонеальної дисемінації, що обмежує можливість радикального лікування. Серед способів боротьби з перитонеальним карциноматозом все частіше використовується інтраопераційна гіпертермічна внутрішньочеревна хіміотерапія (HIPEC), що демонструє збільшення безрецидивної та загальної виживаності у пацієнток з РЯ на поширених стадіях. Певні патофізіологічні аспекти впливу HIPEC на внутрішньочеревний гомеостаз не з'ясовані. Розуміння цього впливу може бути ключем до успішного застосування HIPEC та прогнозування її ефективності у кожному окремому випадку РЯ.

Мета. Оцінити зміни інтраперитонеального гомеостазу у пацієнток з РЯ поширених стадій після застосування HIPEC як етапу циторедуктивної операції, дослідити зміни рівнів експресії ЧНП та ТФР- β в мікрооточенні РЯ в наслідок впливу HIPEC та системної хіміотерапії.

Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 33 пацієнток з РЯ, що лікувались у Львівському регіональному онкоцентрі з 2016 по 2020 р. 12 з них отримали HIPEC. Для всіх пацієнток було отримано первинні культури пухлин,

перитонеального мезотелію та макрофагів, в супернатантах яких визначали активність цитокинів ЧНП та ТФР- β .

Результати. Виявлено зниження концентрацій цитокинів ЧНП, ТФР- β у дренажному вмісті після HIPEC у порівнянні з тими ж показниками в асцитичній рідині до операції. Гіпертермія у системі *in vitro* призводила до зниження експресії ЧНП в добовій культурі зрілих перитонеальних/асцитасоційованих макрофагів, отриманих від хворих з рецидивним РЯ. Зниження було зафіксовано в 10 з 12 випадків.

Висновки. HIPEC має цитокін-модулюючий вплив на інтраабдомінальний гомеостаз хворих з РЯ – пригнічуючи експресію ЧНП перитонеальними макрофагами. Зниження експресії ЧНП в супернатантах культур РЯ було асоційовано з вищою чутливістю до хіміотерапії.

Ключові слова: ЧНП, ТФР- β , перитонеальні макрофаги, мезотелій, запалення, рак яєчника, гіпертермічна інтраперитонеальна хемоперфузія.

Cytokine-modulating influence of hipec on the intraperitoneal homeostasis formation in patients with ovarian cancer

Markiyan Fetsych, Natalia Igumentseva, Severyn Ferneza, Roman Yarema, Natalia Volodko

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Background: Ovarian cancer (OC) has the greatest mortality rate among oncogynecological diseases. Most cases are diagnosed at the peritoneal dissemination stage, resulting in radical treatment. Most cases (75%) are diagnosed in III-IV stages at the stage of peritoneal dissemination, making the radical treatment impossible. Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion (HIPEC), which has ceased to be an experimental technique over the past decade, is increasingly used among the methods of combating peritoneal carcinomatosis and demonstrates an increase in recurrence-free and overall survival in advanced stages of OC. Nevertheless, certain pathophysiological aspects of the effect of HIPEC on intra-abdominal homeostasis, and therefore on the further course of the disease, have not been elucidated. However, understanding this effect may be the key to the successful application of HIPEC and predicting its efficacy in each case of OC.

Objectives: To access changes in intraperitoneal homeostasis in patients with advanced OC after HIPEC procedure (as a stage of cytoreductive surgery); in particular, to evaluate changes of TNF and TGF- β expression under the influence of HIPEC and systemic chemotherapy in the OC microenvironment.

Materials and methods: The study included 33 OC patients treated at Lviv Regional Cancer Centre in 2016–2020. Twelve of them received HIPEC. The primary tumor cultures and primary cultures of peritoneal mesothelium and macrophages were obtained for all patients. The cytokines TNF and TGF- β activity were determined in their conditional media.

Results: The decrease of TNF and TGF- β concentrations in the drainage exudate after HIPEC was revealed compared with the same parameters in the ascitic fluid before the operation. One-hour hyperthermia of the primary culture of peritoneal ascites-associated macrophages of recurrent OC patients decreased the TNF level in conditional media. A decline was found in 10 out of 12 cases.

Conclusions: HIPEC has a cytokine-modulating effect on the intra-abdominal homeostasis of patients with OC, suppressing TNF expression by peritoneal macrophages. Reduced activity of TNF in supernatants of OC primary tumor cultures was associated with higher sensitivity to chemotherapy.

Keywords: TNF, TGF- β intraperitoneal macrophages, mesothelial cell, inflammation, ovarian cancer, hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion.

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2023.02.14

For correspondence: Hasheka 2a str., Lviv, Ukraine, 79000

E-mail: nvolodko@yahoo.com, dr.fetsych@gmail.com

Received: 15 Oct, 2023

Accepted: 31 Oct, 2023

Published: 22 Dec, 2023

ORCID IDs

Markiyan Fetsych:

<https://orcid.org/0000-0002-5375-3968>

Natalya Igumyentseva:

<https://orcid.org/0000-0002-1928-4707>

Severyn Ferneza:

<https://orcid.org/0000-0002-3974-7975>

Roman Yarema:

<https://orcid.org/0000-0001-8314-7945>

Natalia Volodko:

<https://orcid.org/0000-0002-4478-5554>

Disclosures: The authors declared no conflict of interest.

Author contributions:

Conceptualization: Natalia Volodko, Roman Yarema, Markiyan Fetsych;

Results of study: Natalia Volodko, Markiyan Fetsych, Natalia Igumentseva; Severyn Ferneza;

Writing: Natalia Volodko, Markiyan Fetsych, Severyn Ferneza;

Review & editing: Natalia Volodko, Roman Yarema.

Ethical approval: The study was approved by the local ethics committee of the Lviv Regional Cancer Centre

Funding: The authors received no financial support for their study.



© All authors, 2023

Вступ

Рак яєчників (РЯ) характеризується найвищою смертністю серед гінекологічних пухлин. Через свій безсимптомний перебіг РЯ здебільшого діагностується на пізніх стадіях [1], коли вже наявні перитонеальні метастази. Перитонеальна дисемінація є фактором несприятливого прогнозу для пацієнок з РЯ - їх 5-річна виживаність не перевищує 29% [2]. Для цієї категорії хворих застосування хіміотерапії (ХТ) та циторедуктивної операції є необхідними як стандарт та перша лінія терапії. Проте, безрецидивна та загальна виживаність пацієнок з РЯ з перитонеальною дисемінацією становить у середньому 12 та 45 місяців відповідно. Використання HIPEC як етапу циторедуктивної операції покращує їх безрецидивну та загальну виживаність щонайменше на 6-7 місяців [3,4]. Результати клінічних досліджень, отриманих протягом останньої декади продемонстрували ефективність HIPEC [4-6], завдяки чому методика перестала вважатися лише експериментальною та була включена в кілька міжнародних стандартів лікування РЯ. Водночас низка питань щодо патофізіологічних механізмів дії HIPEC залишається відкритими.

Вплив HIPEC на інтраперитонеальний гомеостаз пацієнтів з РЯ вивчений недостатньо. Завдяки внутрішньочеревній перфузії та гіпертермії зростає глибина пенетрації, концентрація та цитотоксичність хіміопрепарату. Висловлювалося припущення щодо імуномодуючого впливу HIPEC через вплив на систему білків теплового шоку [7,8]. В зразках перфузату, отриманому після циторедукції та процедури HIPEC в пацієнок з РЯ виявлено зміни співвідношення субпопуляцій Т-лімфоцитів (CD4/CD8) залежно від її тривалості [9]. Проте серед клітинних компонентів, які формують загальний ландшафт інтраабдомінального гомеостазу більшу роль відіграють мезотеліальні клітини та перитонеальні макрофаги. Біологічно активні продукти їх секреції, рецептори, що експресуються на їх поверхні, можуть сприяти або гальмувати імплантацію вільних ракових клітин з наступним формуванням імплантаційних сфероїдів, їх адгезією, остаточним проявом яких є перитонеальний карциноматоз. Адже очеревина не є пасивним біологічним бар'єром, вона сформова-

на мезотеліальними клітинами, розміщеними на базальній мембрані та підслизовому шарі сполучної тканини, що містить кровеносні та лімфатичні судини, а також нервові закінчення. Саме мезотелій утворює захисний фізіологічний бар'єр на поверхні очеревини, забезпечуючи вільне без прилипання внутрішньочеревне ковзання органів за рахунок секреції протеогліканів та гіалуронату. Активний мезотеліальний мікропіноцитоз залучається в процеси секреції та всмоктування рідини з черевної порожнини. Мезотелій може одночасно експресувати епітеліальні цитокератини та маркери мезенхімальних тканин (виментин, десмін тощо), поступово переходячи від епітеліального до мезенхімального фенотипу залежно від особливостей мікрооточення, зокрема під впливом ТФР- β . Даний феномен відомий як мезотеліально-мезенхімальний перехід [10,11]. Водночас мезотеліальним клітинам притаманні імуномодуючі функції, що реалізуються через експресію цитокінів, а саме MCP-1 (CCL2), CXCL1, IL-1 β , IL-8 (CXCL8) [12], IL-6, IL-10 [13] та IL-15 [14], ТФР- β , тромбоцитарний фактор росту (ТФР), фактор росту фібробластів (ФРФ), гепаринзв'язуючий фактор росту (ГЗФР) та фактор росту ендотелію судин (ФРЕС). Завдяки паракринній активності, особливому спектру рецепторів адгезії мезотелій залучається в процеси репарації, регуляцію пухлинного росту та імплантаційного метастазування.

Не менш значущим компонентом інтраабдомінального гомеостазу слід вважати перитонеальні макрофаги (ПМф). ПМф є високопластичними клітинами, і, у відповідь на різні типи подразнення, вони можуть формувати два основних фенотипи: протипухлинні M1-подібні та пропухлинні M2-подібні [15]. ПМф можуть проявляти цитотоксичність щодо ракових клітин, проте, їх диференціація відбувається під впливом розчинних факторів пухлинного мікрооточення, що призводить до формування фенотипу асцит-асоційованих макрофагів (ААМ), близьких за своїми властивостями до M-2 подібних. Для них характерне зниження тумороцидного потенціалу і підтримка виживання ракових клітин [16]. Цитокіни (ЧНП, ТФР- β , IL-10) та хемокіни (CCL18 та CCL22), секретовані ААМ, забезпечують перехресну взаємодію між макрофагами та пухлинними клітинами,

Introduction

Ovarian cancer (OC) has the highest mortality rate among gynecological cancers. Because of its asymptomatic nature, OC is typically identified in advanced stages [1,2], when peritoneal metastases are already formed. Peritoneal dissemination is a factor of unfavorable prognosis for patients with OC; their 5-year survival does not exceed 29% [2]. For this category of patients, the use of chemotherapy (ChT) and cytoreductive surgery is the standard first-line therapy. However, recurrence-free and overall survival of OC patients with peritoneal dissemination are, on average, 12 and 45 months, respectively. HIPEC, as a stage of cytoreductive surgery, increases recurrence-free and overall survival by at least 6–7 months [2, 3]. The results of clinical trials of the last decade confirmed the efficacy of HIPEC [4-6]. Therefore, this technique was no longer considered just experimental and has been included in some international guidelines as an optional procedure for treating OC. However, some questions about the pathophysiological mechanisms of its action remain unclear.

The effect of HIPEC on intraperitoneal homeostasis in OC patients has not been sufficiently studied. Intra-abdominal perfusion and hyperthermia have been observed to increase the depth of penetration, concentration, and cytotoxicity of the chemotherapy drug. In this respect, HIPEC is assumed to have an immunomodulation effect due to its action on the heat shock protein system. [7, 8]. The perfusate samples taken from patients with OC after cytoreduction and HIPEC revealed changes in the ratio of T-lymphocyte subpopulations (CD4/CD8) depending on their duration [9]. However, out of all cellular components that form the overall landscape of intra-abdominal homeostasis, mesothelial cells and peritoneal macrophages have the greatest importance. Biologically active products of their secretion, receptors expressed on their surface, can stimulate or prevent free cancer cell implantation, followed by the formation of implantation spheroids and their adherence, and peritoneal carcinomatosis. The peritoneum is not a passive biological barrier; it is formed by mesothelial cells located on the basement membrane and the submucosal layer of connective tis-

sue, which contains blood, lymphatic vessels, and nerve endings. Mesothelium, in particular, forms a protective physiological barrier on the surface of the peritoneum, ensuring free, non-sticking intra-abdominal gliding of organs due to proteoglycan and hyaluronate production. Active mesothelial micropinocytosis is involved in the secretion and absorption of fluid from the abdominal cavity. The mesothelium can simultaneously express epithelial cytokeratins and markers of mesenchymal tissues (vimentin, desmin, etc.), progressively transitioning from an epithelial to a mesenchymal phenotype depending on the microenvironment character, in particular under the influence of TGF- β . This is referred to as the mesothelial-mesenchymal transition [10,11]. At the same time, mesothelial cells have immunomodulatory functions, revealed through the expression of cytokines, namely MCP-1 (CCL2), CXCL1, IL-1 β , IL-8 (CXCL8) [12], IL-6, IL-10 [13] and IL-15 [14], TGF- β , platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), heparin-binding growth factor (HBGF), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Due to paracrine activity and a unique spectrum of adhesion receptors, mesothelium is involved in healing processes, regulation of tumor growth, and implantation metastasis.

Peritoneal macrophages (PMs) are equally important components of intra-abdominal homeostasis. PMs are highly plastic cells that can form two distinct phenotypes in response to various stimuli: antitumor M1-like and protumor M2-like [15]. PMs can be cytotoxic to cancer cells; however, their development occurs under the influence of soluble substances in the tumor microenvironment, creating ascites-associated macrophages (AAMs), which have properties similar to M2. They lower tumoricidal potential and provide less support for cancer cell survival [16]. Cytokines (TNF, TGF- β , IL-10) and chemokines (CCL18 and CCL22) produced by AAMs ensure cross-interaction between macrophages and tumor cells, promote tumor growth, progression, metastasis, and the formation of chemotherapy resistance [16, 17]. Apart from cancer cells, AAMs are the predominant population in ascites. In the AAM subpopulation, the immune response-related signaling pathways are sup-

сприяють росту пухлини, прогресії, метастазуванню, формуванню хеморезистентності [16,17]. Саме ААМф є домінуючою популяцією в асциті крім ракових клітин. Сигнальні шляхи, що відповідають за імунну відповідь у субпопуляції ААМ пригнічені. Експресованими виявляються гени, що відповідають за підтримку пухлинного росту та імплантацію пухлинних комплексів [17].

Питання про те, на які ланки мікрофізіологічного ланцюга в ході імплантаційного метастазування впливає НІРЕС та продукти секреції мезотелію та перитонеоцитів макрофагів (зокрема ЧНП та ТФР- β), залишається відкритим. Не ясно, чи діє НІРЕС лише на пухлинні клітини, чи її дія опосередкована впливом на цитокіновий регуляторний каскад. Не зрозуміло, які саме клітини формують основний пул цитокінів ЧНП та ТФР- β і як впливає на рівень їх експресії гіпертермія.

З метою подальшого вивчення зазначених питань проведено порівняльне дослідження: 1) вмісту цитокінів ЧНП і ТФР- β в асциті, плазмі та дренажному ексудаті після НІРЕС хворих на РЯ, експресії цих цитокінів в супернатантах первинних добових культур РЯ в системі *in vitro*; 2) в супернатантах первинних добових культур, збагачених мезотелієм та перитонеальними макрофагами; 3) динаміки цих показників в умовах гіпертермії.

Матеріали та методи

Пацієнти

У дослідженні взяли участь 33 пацієнтки з рецидивним РЯ, що лікувались у Львівському регіональному онкоцентрі з 2017 по 2020 р. Середній вік пацієток – 54+ роки. Гістологічна будова 31 пухлини відповідала серозній низькодиференційованій (high grade) карциномі, двох – світлоклітинній карциномі. Всім пацієткам як етап протирецидивного лікування виконано повторну циторедукцію. 12 з них отримали НІРЕС. Для всіх пацієток було отримано первинні пухлинні культури, в супернатантах яких визначали активність цитокінів ЧНП та ТФР- β .

Підготовка первинної культури клітин

Подрібнену пухлину переносили в стерильний скляний флакон з 20 мл 0,02% розчи-

ну колагенази (Worthington, USA) у ФСО для ферментативної дезагрегації тканини при постійному перемішуванні на магнітній мішалці у водяній бані при 37°C протягом 20-30 хв. Отриману суспензію клітин фільтрували через стерильний капроновий фільтр у флаконі на 15 мл, та центрифугували. Надосадову рідину зливали у склянку з подрібненою тканиною і повторювали процес дезагрегації. Одержаний клітинний осад переносили у флакон на 15 мл, що містив 5 мл середовища RPMI-1640 («Gibco»). Після цього клітини суспензували в поживному середовищі RPMI-1640 без сироватки. Кількість живих клітин підраховували в камері Горяєва в присутності 0,1% водяного розчину трипанового синього, який забарвлював мертві клітини. Для роботи використовували суспензії клітин, життєздатність яких перевищувала 80%. Одержану суспензію дезагредованих, відмитих клітин пухлинного матеріалу розводили поживним середовищем RPMI-1640 та переносили в культуральний посуд для подальшої інкубації в термостаті з 5% CO₂, при 37°C на протязі 24 год. Після добової інкубації клітин, середовище в якому вони росли, зливали у флакон (на 15 мл) та центрифугували його для очистки від домішок. Отриману рідину розливали по 1 мл в кріопробірки та зберігали при – 80°C та подальшого дослідження.

Визначення активності ЧНП за цитотоксичною дією на чутливу культуру трансформованих мишачих фібробластів L-929

Біологічний метод визначення активності ЧНП за цитотоксичною дією на чутливу культуру трансформованих мишачих фібробластів L-929. Визначення активності ЧНП проводилося біологічним методом з використанням чутливих до ЧНП моношарової культури клітин трансформованих мишачих фібробластів L-929, які культивувалися в середовищі RPMI-1640 (Gibco). В якості нульового контролю (K₀) брали тільки середовище RPMI-1640 (без сироватки) без клітин L-929, а другого контролю (K₁) – клітини L-929 з поживним середовищем RPMI-1640 без сироватки (TEC). За 4 години до закінчення інкубації в кожному лунку вносили по 15 мкл МТТ – барвника (5 мг/мл) [3-(4,5-dimethylthiazol – 2yl)- 2,5- diphenyltetrazolium bromide]. Суть методу ґрунтується на здатності

pressed, while the genes associated with cancer development and the implantation of tumor complexes are expressed [17].

The question of which links of the micro physiological chain in the process of implantation metastases are impacted by HIPEC and the secretion products of mesothelium and peritoneal macrophages (particularly TNF and TGF- β) remains unanswered. It is unclear whether HIPEC operates solely on tumor cells or whether it influences the cytokine regulatory cascade. It is also unclear which cells form the main pool of TNF and TGF- β cytokines and how hyperthermia affects their expression levels.

Aiming to understand more about the questions above, the present study provides a comparative analysis of 1) the levels of the TNF and TGF- β cytokines in the ascites, plasma, and drainage exudate after HIPEC in patients with OC; expression of these cytokines in the supernatants of primary daily cultures of OC in the *in vitro* system; 2) the dynamics of these indicators in hyperthermia.

Materials and Methods

Patients

The study included 33 patients with recurrent OC treated at the Lviv Regional Cancer Centre between 2017 and 2020. The average age of patients was 54. The histological structure of 31 tumors was serous low-differentiated high-grade carcinoma, 2 – clear cell carcinoma. All patients underwent repeated cytoreduction as a stage of anti-relapse treatment. Twelve of them received HIPEC. All patients had primary cultures of peritoneal mesothelium and macrophages taken, and the activity of the cytokines TNF and TGF- β measured in them.

Preparation of primary cell culture

The tumor, resected and chopped with scissors, was placed in a sterile glass vial with 20 ml of 0.02% collagenase solution (Worthington, USA) in buffered saline solution for enzymatic tissue disaggregation. This procedure took 20 to 30 minutes and involved constant stirring on a magnetic stirrer in a water bath at 37 °C. The acquired cell suspension was filtered through a sterile kapron

filter in a 15-ml vial and centrifuged. The supernatant liquid was added to a beaker containing shredded tissue, and the disaggregation procedure was repeated. The cell pellet that emerged was placed into a 15-ml vial that contained 5 ml of RPMI-1640 medium (Gibco). Cells were then suspended in a serum-free RPMI-1640 nutrient medium. The number of living cells was counted in a Goriaev chamber in the presence of a 0.1% aqueous solution of trypan blue, which colored dead cells. Cell suspensions with more than 80% viability were used for the study. The resultant suspension of disaggregated, washed tumor cells was diluted with RPMI-1640 medium and placed in a culture dish for 24 hours of incubation in a thermostat with 5% CO₂ at 37°C. After daily incubation of cells, the conditional medium was poured into a vial (15 ml) and centrifuged to remove impurities. The resulting liquid was placed into 1 ml cryotubes and kept at -80°C for future research.

Determining TNF activity by the cytotoxic effect on a sensitive culture of modified mouse fibroblasts L-929

Biological method of determining the activity of TNF by the cytotoxic effect on a sensitive culture of modified mouse fibroblasts L-929. TNF activity was measured biologically using a TNF-sensitive monolayer culture of cells from transformed L-929 murine fibroblasts grown in RPMI-1640 medium (Gibco). A serum-free RPMI-1640 medium without L-929 cells was used as a zero control (K₀), and L-929 cells with a serum-free RPMI-1640 medium were used as the second control (K₁). Four hours before the end of incubation, 15 μ l of MTT dye (5 mg/ml) [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] was added to each well. The approach is based on the ability of the mitochondrial dehydrogenase of living cells to split the tetrazolium rings of the yellow MTT dye and form dark blue formazan crystals impermeable through the membrane and accumulate in living cells. After 4 hours of incubation in a CO₂ incubator, the medium was carefully aspirated from each well, and 100 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to release and further dissolve the formed crystals. The solution turned blue in this process. The level of the produced formazan product is directly

мітохондріальної дегідрогенази живих клітин розщеплювати кільця тетразолію жовтого МТТ – барвника та утворювати темносині кристали формазану, які є непроникні через мембрану і нагромаджуються в живих клітинах. Через 4 години інкубації в CO₂-інкубаторі з кожної лунки обережно відсмоктували середовище, додавали по 100 мкл диметилсульфоксиду (DMSO) для вивільнення та подальшого розчинення утворених кристалів. Розчин при цьому зафарбовується у синій колір. Кількість живих клітин є прямо пропорційна до рівня утвореного формазанного продукту. Вимірюючи поглинання світла при 490 нм визначали рівень впливу досліджуваних зразків на життєздатність клітин мішеней L-929. Для оцінки результатів враховували мітотичний індекс (MI) $MI = D/K \times 100\%$, де D – середнє значення абсорбції досліджуваних зразків; K – середнє значення абсорбції контрольних зразків [18]. Для визначення концентрації ЧНП користувалися калібрувальною кривою, побудованою за результатами впливу різних концентрацій рекомбінантного ЧНП-а на клітини L-929.

Визначення активності ТФР-β за ріст-інгібуючою дією на клітинну культуру CCL-64

Визначення активності ТФР-β проводили біологічним методом з використанням чутливої до ТФР-β культури CCL-64 (Mv1Lu; American Type Culture Collection Rockville, Md) епітелію легень норки. На цю культуру ТФР-β має ріст-інгібуючий вплив. Моношарові клітини лінії CCL-64 інкубували в поживному середовищі DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium, «Sigma»). Для експерименту брали клітини третього пасажу після розморожування, коли вони досягали субконфлюенту. Після трипсинізації в 0,25% розчині трипсину в ФСБ (фізіологічно сольовому буфері, pH 7,2) клітини відмивали в середовищі RPMI-1640 («Sigma») з 20% ТЕС центрифугуючи їх 3 хв при 1500 об/хв, осад клітин ресуспендували в середовищі RPMI-1640 з 10% ТЕС і 50 мкг/мл гентаміцин сульфату, та рахували кількість живих клітин в камері Горяєва. ТФР-β тест-зразки додавалися в лунки з клітинами CCL-64 Вплив ТФР-β на синтез ДНК в клітинах-мішенях обраховували за допомогою індекса стимуляції (SI): $SI = D/N \times 100\%$, де D- середнє значення абсорбції досліджуваних зразків; N- середнє значення абсорбції

контрольних зразків (використано МТТ) [19]. Для визначення концентрації ТФР-β в дослідних зразках використовували попередньо побудовану колібрувальну криву залежних концентрацією рекомбінантного ТФР-β («Gibco»), внесеного в супернатант клітин-мішеней і ступенем пригнічення в них синтезу ДНК.

Отримання добової культури перитонеальних макрофагів (ПМф)

Зразки перитонеального змиву (60-100 мл), які брали під час операції, центрифугували. Клітинний осад збирали та нашаровували його на 3 мл розділяючого розчину фікол-верографітну (густина розчину $\rho=1,077$ г/мл). Після центрифугування при 1500 об/хв протягом 20 хв утворену клітинну суспензію на межі фаз збирали, тричі відмивали ФСБ центрифугуванням при тих же умовах. Осад клітин інкубували в чашках Петрі з поживним середовищем RPMI-1640 протягом 1 год в CO₂ інкубаторі (температура 37° С; 5% CO₂). Середовище з клітинами, які не прикріпилися, відсмоктували, а налипли мононуклеари змивали свіжим середовищем RPMI-1640 без сироватки. Клітини суспендували в 2-3 мл середовища та оцінювали їх життєздатність, підраховуючи кількість живих клітин в камері Горяєва із застосуванням 0,1% водного розчину трапанового синього. В роботу брали зразки, в яких кількість живих клітин перевищувала 90%.

Моделювання впливу гіпертермії in vitro

З метою моделювання, культури макрофагів прогрівались до 39°С протягом години, після чого культивування продовжувалась при 37°С протягом доби у дослідженій групі, в контрольній – у весь період часу. Клітини висівали у чашки Петрі з поживним середовищем RPMI-1640 та ікубували при 37°С та 39°С у CO₂ інкубаторі з містом 5% CO₂.

Отримання добової культури мезотелію

Зішкріб епітеліального шару клітин з черевної порожнини під час операції з леза скальпеля з клітинами в 15 мл середовища RPMI-1640 з операційної поступали в лабораторію, де клітини тричі відмивали у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) центрифугуванням. Осад клітин розводили в середовищі RPMI-1640 без сироватки в невеликій кількості та клітини рахували в камері Горяєва. Клітини висівали у чашки Петрі з поживним середо-

linked to the quantity of live cells. The degree of the impact of examined materials on the viability of L-929 target cells was assessed by measuring light absorption at 490 nm. To assess the results, we calculated the mitotic index (MI) $MI = D/K \times 100\%$, where D is the average absorption value of the examined samples, and K is the average absorption value of the control samples [18]. To assess the results, we calculated the mitotic index (MI), defined as $MI = D/K \times 100\%$, where D is the average absorption of the examined samples, and K is the average absorption of the control samples [18]. Based on the effects of various concentrations of recombinant TNF on L-929 cells, a calibration curve was created to measure the concentration of TNF.

Determining TGF- β activity by its growth-inhibitory effect on CCL-64 cell culture

The activity of TGF- β was measured using a biological approach with TGF- β sensitive cortical lung epithelial culture CCL-64 (Mv1Lu; American Type Culture Collection Rockville, Md). TGF- β inhibits cell proliferation in this culture. Monolayer cells of the CCL-64 line were cultured in DMEM nutritional medium (Dulbecco's Modified Eagles Medium, "Sigma"). Cells of the third passage after thawing, when they reached subconfluent, were taken for the experiment. After trypsinization in a 0.25% solution of trypsin in PSB (physiological saline buffer, pH 7.2), cells were washed in RPMI-1640 medium ("Sigma") with 20% fetal calf serum by centrifuging them for 3 min at 1500 rpm, the cell pellet was resuspended in RPMI-1640 medium with 10% fetal calf serum and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin sulfate and counted the number of living cells in the Goriaev chamber. TFR- β test samples were added to wells containing CCL-64 cells. The stimulation index (SI) was used to determine the effect of TRF- β on DNA synthesis in target cells: $SI = D/N \times 100\%$, where D is the average absorbance value of the examined samples, and N is the average absorbance value of the control samples (MTT was used in this case). A previously prepared calibration curve was used to measure the concentration of TFR- β in test samples based on the concentration of recombinant TFR- β ("Gibco") injected into the supernatant of the target cells and the degree of inhibition of DNA synthesis in them.

Obtaining a daily culture of peritoneal macrophages (PMF)

Samples of peritoneal lavage (60–100 ml), which were taken during the operation, were centrifuged. The cell sediment was collected and layered on 3 ml of Ficol-Verographite separating solution (density of the solution $\rho=1.077 \text{ g}/\text{ml}$). After centrifugation at 1500 rpm for 20 min, the formed cell suspension at the phase boundary was collected and washed three times with PSB by centrifugation under the same conditions. The cell sediment was incubated in Petri dishes with nutrient medium RPMI-1640 for 1 hour in a CO₂ incubator (temperature 37 C; 5% CO₂). The medium with non-adherent cells was aspirated, and adherent mononuclear cells were washed away with fresh serum-free RPMI-1640 medium. The cells were suspended in 2–3 ml of medium, and their vitality was determined by counting the number of living cells in the Goriaev chamber using a 0.1% aqueous solution of trypan blue to color. This study used samples with more than 90% live cells.

The modeling of hyperthermia effect on macrophages in vitro

For modeling purposes, macrophage primary cultures were heated to 39°C for an hour before being kept at 37°C for a day in the studied group and for the entire time in the control group. Cells were seeded in Petri dishes with nutrient medium RPMI-1640 and incubated at 37°C and 39°C in a CO₂ incubator containing 5% of CO₂.

Obtaining a daily culture of mesothelium

The epithelial layer of cells was scraped from the abdominal cavity during surgery using a scalpel blade. Collected cells were transferred to the laboratory in 15 ml of RPMI-1640 medium, where they were centrifuged three times in phosphate-buffered saline (PBS). A small amount of the cell pellet was diluted in serum-free RPMI-1640 medium, and cells were counted in a Goriaev chamber. Cells were seeded in Petri dishes with RPMI-1640 nutrient medium and cultured in a CO₂ incubator with a setting of 5% CO₂ at 37°C and 39°. After incubation, the medium was collected and centrifuged to remove cellular debris from the solution. The supernatant medium was kept at -80° C.

вищем RPMI-1640 та ікубували при 37°C та 39°C у CO₂ інкубаторі з містом 5% CO₂. Після закінчення інкубації, середовища збирали та центрифугували для очищення розчину від клітинного дебрису. Зберігали супернатанте середовище при – 80°C.

Методи статистичної обробки одержаних результатів дослідження

Для первинної обробки даних використано пакет прикладних програм MS Excel 2000. Первинна обробка даних включала: відбір, стандартизацію даних для проведення аналізу, аналіз однорідності вибірок, визначення типу розподілу. Обробка даних проводилася з використанням програмного забезпечення Statistica 10.0. та StatTech v. 1.2.0. Всі отримані дані проходили перевірку на нормальність розподілу шляхом аналізу показників асиметрії, ексцесу, аналізу боксплотів та результатів обрахунку критерію Шапіро-Уїлка (Додаток Табл 5.1 та 5.2). За результатами аналізу розподілу було прийняте рішення, що розподіл не відповідає нормальному, тому було застосовано відповідні стандарти представлення центральної тенденції та критерії перевірки різниці між групами. Для представлення даних було використано медіану та квартилі у вигляді Me (25%; 75%), де Me – медіана, 25% - перший квартиль, 75 % - третій квартиль. Додатково вказувалися у таблицях мінімальні та максимальні значення у групі. Для порівняння між групами було застосовано Н-критерій Краскела-Уолліса, при достовірності різниці проводився апостеріорний (пост-хок) аналіз для попарного порівняння із застосуванням тесту Дана.

Всі статистичні обрахунки зроблено із застосуванням програмного забезпечення RStudio v 1.4.1106 на базі R v 4.1.0.

Результати

З метою з'ясування внеску кожної субпопуляції досліджуваних клітин в формування загального інтраабдомінального пулу цитокінів було досліджено концентрації ЧНП та ТФР- β у супернатантах первинних культур мезотелію, перитонеальних/асцитасоційованих макрофагів та РЯ (Табл. 1).

Виявилось, що основний «внесок» у формування інтраабдомінального рівня ЧНП здійснюють ракові клітини та макрофаги. Водночас, рівні експресії ТФР- β як макрофагами, так і мезотелієм майже не відрізнялися, проте були нижчими, ніж рівень експресії ТФР- β в культурах РЯ.

Для дослідження зв'язку між відповіддю на системну ХТ та рівнями експресії цитокінів в кондиціонованих пухлинних середовищах РЯ пацієнток було розподілено на підгрупи залежно від тривалості безрецидивного періоду від моменту завершення ад'ювантної хіміотерапії після первинного лікування до появи ознак прогресування. В групу високочутливих до хіміотерапії хворих було включено тих, в кого ознаки прогресування хвороби було виявлено більше ніж через 12 місяців після завершення АХТ. В групу помірно- і низькочутливих до хіміотерапії ввійшли пацієнтки, в яких рецидив виник менше ніж за 12 місяців. Всі вони отримали 3 цикли протирецидивної хіміотерапії до повторної циторедукції.

У виділених групах хворих проаналізовано рівні ЧНП і ТФР- β в мікрооточенні РЯ. Виявлено суттєву різницю між рівнями експресії ЧНП у супернатантах первинних клітинних культур РЯ хворих цих груп. Зокрема, концентрація ЧНП у супернатантах пухлин у помірно/низькочутливих до ХТ хворих була високою – досягала майже $1,52 \pm 0,13$ нг/мл (Табл. 2). Натомість у групі клінічно чутливих до ХТ

Таблиця 1

Концентрації ЧНП та ТФР- β у супернатантах первинних культур мезотелію, перитонеальних/асцитасоційованих макрофагів та РЯ

Цитокін	Концентрація цитокіну в супернатантах добових первинних клітинних культур, нг/мл		
	Мезотелій (n = 10)	Перитонеальні/ ААМф (n = 11)	Ракові клітини (n = 12)
ЧНП	0,02 \pm 0,01	1,06 \pm 0,88	1,47 \pm 0,84
ТФР- β	1,96 \pm 1,81	1,98 \pm 0,79	2,82 \pm 1,51

Примітка: $p < 0,05$ (для ЧНП в культурі мезотелію та ракових клітин).

Methods of statistical processing of the results

The study involved the MS Excel 2000 package for primary data processing, which included sample selection, data standardization for analysis, sample homogeneity analysis, and distribution type determination. Such software as Statistica 10.0 and StatTech v. 1.2.0 were used for data processing. Asymmetry indicators, kurtosis, boxplot analysis, and Shapiro-Wilk test results (Appendix Tables 5.1 and 5.2) were used to evaluate the normality of the distribution of the obtained data. Based on the distribution analysis results, it was concluded that the distribution was not normal. Thus, appropriate standards of representation of central tendency and criteria for testing the difference between groups were applied. The data was presented using the median and quartiles as Me (25%; 75%), where Me is the median, 25% is the first quartile, and 75% is the third quartile. In addition, tables showed the group's minimum and maximum values. The Kruskal-Wallis H-test was used to compare groups, and in case of significant differences, a posteriori (post hoc) analysis using Dan's test was carried out.

All statistical calculations were performed using the R-based RStudio v 1.4.1106.

Results

To determine the contribution of each subpopulation of studied cells to the formation of the total intra-abdominal pool of cytokines, the concentrations of TNF and TGF- β in the supernatants of primary cultures of mesothelium, peritoneal/ascites-associated macrophages, and OC were investigated (Table 1).

Cancer cells and macrophages appear to provide the most "contribution" to the formation

of the intra-abdominal level of TNF. At the same time, expression levels of TGF- β by both macrophages and mesothelium were almost the same but lower than TGF-expression levels in OC cultures.

To study the relationship between the response to systemic ChT and the levels of cytokine expression in conditioned tumor medium, patients were divided into subgroups depending on the duration of the relapse-free period from the moment of completing adjuvant chemotherapy (AChT) after primary treatment until the appearance of progression signs. The group of patients highly sensitive to chemotherapy included those who showed evidence of disease progression more than 12 months after the end of AChT. Patients with a relapse in fewer than 12 months were included in the group of patients with moderate and low sensitivity to chemotherapy. All of them received 3 cycles of anti-relapse chemotherapy before recurrent cytoreduction.

In selected groups of patients, the levels of TNF and TGF- β in the microenvironment of the OC were analyzed. A significant difference between the expression levels of TNF in the supernatants of primary cell cultures of OC patients of these groups was revealed. TNF concentrations in tumor supernatants were particularly high in individuals who were moderately/lowly sensitive to ChT, reaching almost 1.52 0.13 ng/ml (Table 2). The equivalent indicator, on the other hand, was much lower in the group of tumors clinically sensitive to ChT: 0.65 0.08 ng/ml. TGF-expression levels showed the opposite tendency. The concentration of TGF- β in samples of highly sensitive and moderately/lowly sensitive tumors to ChT differed and was higher in the ChT-sensitive

Table 1

Concentrations of TNF and TGF- β in supernatants of primary cultures of the mesothelium, peritoneal/ascites-associated macrophages and OC

Cytokine	Cytokine concentration in supernatants of daily primary cell cultures, ng/ml		
	Mesothelium (n = 10)	Peritoneal/ AAM (n = 11)	Cancer cells (n = 12)
TNF	0,02 ± 0,01	1,06 ± 0,88	1,47 ± 0,84
TGF- β	1,96 ± 1,81	1,98 ± 0,79	2,82±1,51

Note: p < 0.05 (for TNF in the culture of mesothelium and cancer cells).

пухлин відповідний показник виявився значно нижчим – $0,65 \pm 0,08$ нг/мл. Рівні експресії ТФР- β мали протилежну тенденцію. Концентрація ТФР- β у зразках високочутливих та помірно/низькочутливих до ХТ пухлин також відрізнялась і була вищою в групі чутливих до ХТ пухлин ($4,61 \pm 0,82$ нг/мл), у групі більш резистентних до ХТ РЯ вона знижувалась ($3,76 \pm 0,54$ нг/мл) (Табл. 2).

З метою дослідження впливу гіпертермічного режиму інтраперитонеальної хіміотерапії на прозапальні цитокіни в черевній порожнині ми провели визначення рівня ЧНП та ТФР- β у серозному вмісті, який отримано з абдомінальних дренажів у 12 пацієнтів через 20 год після циторедукції та процедури HIPEC і порівняли їх з концентраціями цитокінів в асциті до лікування (Табл. 3).

Рівень ЧНП в асцитичній рідині до операції становив $0,858$ нг/мл, рівень ЧНП в дренажному вмісті тих самих пацієнтів, отриманих

через 17-20 год після циторедукції з HIPEC був вірогідно нижчим ніж рівень ЧНП в асциті і плазмі хворих і коливався від $0,005$ до $0,048$ нг/мл і становив в середньому $0,04$ нг/мл. Аналогічна тенденція до значного зниження спостерігалася для концентрації ТФР- β .

З метою дослідження впливу гіпертермії на рівень експресії ЧНП та ТФР- β в популяції перитонеальних/асцитасоційованих макрофагів частину культуральних планшетів із первинними макрофагальними культурами на 1 годину помістили в термостат при 40°C після чого продовжували інкубацію при 37°C до завершення доби. Другу частину планшетів інкубували лише при 37°C . Після завершення інкубації культуральний надосад було відібрано і заморожено до визначення рівня цитокінів (Табл. 4).

Обрахунок отриманих даних за критерієм Краскела-Уолліса дозволив представити їх наступним чином (Табл. 5):

Таблиця 2

Концентрації ЧНП та ТФР- β у супернатантах первинних культур раку яєчника хворих, клінічно чутливих і резистентних до ХТ

Цитокін	Концентрація цитокіну в супернатантах первинних клітинних культур РЯ, нг/мл	
	Група високо чутливих до ХТ РЯ ($n = 12$)	Група помірно/низько чутливих до ХТ РЯ ($n = 11$)
ЧНП	$0,650 \pm 0,084$	$1,52 \pm 0,13$
ТФР- β	$4,61 \pm 0,82$	$3,76 \pm 0,54$

Примітка: $p < 0,05$ (для ЧНП).

Таблиця 3

Рівні ЧНП і ТФР- β у біологічних рідинах пацієнтів з рецидивним РЯ після виконання циторедукції та HIPEC

Цитокін	Концентрація цитокіну в біологічних рідинах хворих з рецидивним РЯ, нг/мл		
	Асцит ($n = 9$)	Дренажний вміст ($n = 12$)	Сироватка ($n = 10$)
ЧНП	$0,858 \pm 0,09$	$0,04 \pm 0,014$	$0,648 \pm 0,041$
ТФР- β	$6,06 \pm 0,81$	$0,82 \pm 1,51$	$1,82 \pm 0,82$

Примітка: $p < 0,05$ (для ЧНП).

Таблиця 4

Концентрації ЧНП та ТФР- β у супернатантах первинних клітинних культур перитонеальних/асцитасоційованих макрофагів

Цитокін	Концентрація цитокіну в супернатантах первинних клітинних культур перитонеальних/асцитасоційованих макрофагів, нг/мл	
	Інкубація тільки при 37°C ($n = 12$)	Години інкубація 40°C ($n = 12$)
ЧНП	$1,063 \pm 0,88$	$0,48 \pm 0,61$
ТФР- β	$1,98 \pm 0,79$	$1,60 \pm 1,94$

Примітка: $p < 0,05$ (для ЧНП).

tumors (4.61 0.82 ng/ml). In contrast, the group more resistant to ChT OC decreased (3.76 0.54 ng/ml) (Table 2).

To study the effect of the hyperthermic mode of intraperitoneal chemotherapy on pro-inflammatory cytokines in the abdominal cavity, we determined TNF and TGF- levels in serous contents obtained from abdominal drains in 12 patients 20 hours after cytoreduction and the HIPEC procedure. We compared them to cytokine concentrations in ascites before treatment (Table 3).

The level of TNF in ascitic fluid before surgery was 0.858 ng/ml; the level of TNF in the drainage content of the same patients obtained 17–20 hours after cytoreduction with HIPEC were probably lower than the levels of TNF in the ascites and plasma of patients. The concentration of TGF-β showed a similar tendency of significant decline.

To study the effect of hyperthermia on the level of expression of TNF and TGF-β in the population of peritoneal/ascites-associated macrophages, a portion of the culture plates containing primary macrophage cultures were placed in a thermostat at 40°C for 1 hour, followed by incubation at 37°C until the end of the day. The second portion of the plates was incubated only at 37°C. After the incubation, the culture supernatant was collected and frozen until the cytokine level was measured. (Table 4).

The received data processed based on Kruskal-Wallis's criterion enabled to present it as follows (Table 5):

The graph clearly shows the difference in TNF concentrations in supernatants in primary cul-

Table 2

Concentrations of TFN and TGF-β in supernatants of primary cultures of OC patients clinically sensitive and resistant to ChT

Cytokine	Cytokine concentration in primary supernatants of cell cultures of OC, ng/ml	
	A group of highly sensitive OC patients to ChT (n = 12)	Moderately/lowly sensitive group of OC patients to ChT (n = 11)
TNF	0,650 ± 0,084	1,52 ± 0,13
TGF-β	4,61 ± 0,82	3,76 ± 0,54

Note: p < 0,05 (for TNF).

Table 3

TNF and TGF-β levels in biological fluids of patients with recurrent OC after cytoreduction and HIPEC

Cytokine	Cytokine concentration in biological fluids of patients with recurrent OC, ng/ml		
	Ascites (n = 9)	Drainage exudate (n = 12)	Serum (n = 10)
TNF	0,858 ± 0,09	0,04 ± 0,014	0,648 ± 0,041
TGF-β	6,06 ± 0,81	0,82 ± 1,51	1,82 ± 0,82

Note: p < 0,05 (for TNF).

Table 4

TNF and TGF-β concentrations in supernatants of primary cultures of peritoneal/ascites-associated macrophages

Cytokine	Cytokine concentration in supernatants of primary cultures of peritoneal/ascites-associated macrophages, ng/ml	
	Incubation only at 37°C (n = 12)	Hours of incubation 40°C (n = 12)
TNF	1,063 ± 0,88	0,48 ± 0,61
TGF-β	1,98 ± 0,79	1,60 ± 1,94

Note: p < 0,05 (for TNF).

Таблиця 5

Концентрація цитокіну ЧНП в біологічних рідинах та супернатантах первинних культур мезотелію, пухлинних клітин, асцитасоційованих макрофагів з та без гіпертермії

Група	Me (25%; 75%)	Min	Max	N
Дренаж	0,02 (0,01; 0,03)	0,004	0,050	9
Мезотелій	0,02 (0,02; 0,03)	0,002	0,041	10
макрофаги без прогрівання	1,04 (0,16; 1,65)*#	0,016	2,500	11
макрофаги з прогріванням	0,05 (0,01; 0,91)	0,005	1,590	12
Пухлина	1,41 (0,40; 1,50)*#	0,042	5,000	6

Me - медіана, 25% - перший кватиль, 75 % - третій кватиль, Min – мінімальне значення у вибірці, Max – максимальне значення у вибірці, N – об'єм вибірки, * - достовірність різниці при порівнянні із групою «дренаж», # - достовірність різниці при порівнянні із групою «мезотелій».

Аналіз графіка чітко демонструє різницю концентрації ЧНП в супернатантах первинних культур асцитасоційованих макрофагів до і після прогрівання. (Рис. 1)

За результатами обрахунку критерію Краскала-Уолліса встановлено достовірність

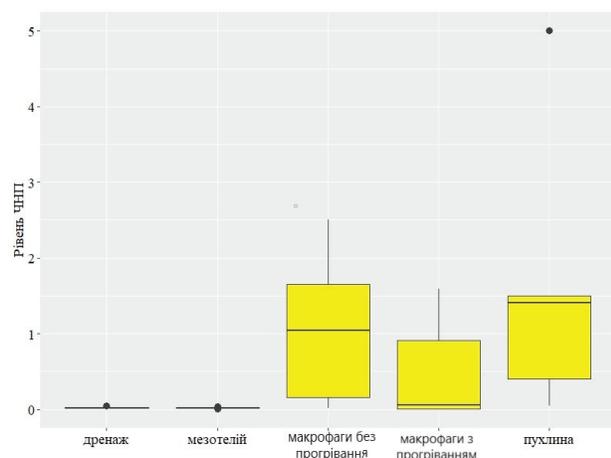


Рисунок 1. Концентрації ЧНП у супернатантах первинних культур РЯ, перитонеального мезотелію, ААМ

різниці між групами для показника ЧНП ($p=0,001$). При апостеріорному аналізі із застосуванням тесту Дана встановлено достовірність різниці у парах «макрофаги без прогрівання – дренажний ексудат» ($p=0,03$), «пухлина-дренажний ексудат» ($p=0,02$), «макрофаги-мезотелій» ($p=0,04$), та «пухлина-мезотелій» ($p=0,03$) (Табл. 6).

За результатами обрахунку критерію Краскала-Уолліса не виявлено достовірності різниці між групами для показника ТФР- β ($p = 0,23$), тому попарне порівняння не проводилося.

Аналіз виконаних досліджень засвідчив, що в супернатантах макрофагальних культур після годинного прогрівання вірогідно зниженою була концентрація ЧНП. Зниження було зафіксовано в 10 з 12 випадків. Середня концентрація ЧНП знизилася після прогрівання з 1,06 до 0,48 нг/мл.

Концентрація ТФР- β макрофагальних культур у зразках також мала тенденцію до зниження проте спостерігалася рідше у 8 з

Таблиця 6

Концентрація цитокіну ТФР- β в біологічних рідинах та супернатантах первинних культур мезотелію, пухлинних клітин, асцитасоційованих макрофагів з та без гіпертермії

Група	Me (25%; 75%)	Min	Max	N
Дренаж	0,55 (0,19; 2,84)	0,156	7,840	10
Мезотелій	1,25 (0,92; 2,49)	0,199	5,680	12
макрофаги без прогрівання	1,76 (1,46; 2,09)	1,186	3,744	12
макрофаги з прогріванням	0,92 (0,11; 1,84)	0,038	6,282	12
Пухлина	0,50 (0,13; 1,44)	0,052	3,952	6

Me - медіана, 25% - перший кватиль, 75 % - третій кватиль, Min – мінімальне значення у вибірці, Max – максимальне значення у вибірці, N – об'єм вибірки.

Table 5

TNF concentration in biological fluids and supernatants of primary cultures of mesothelium, tumor cells, and ascites-associated macrophages with and without hyperthermia

Group	Me (25%; 75%)	Min	Max	N
Drainage exudate	0,02 (0,01; 0,03)	0,004	0,050	9
Mesothelium	0,02 (0,02; 0,03)	0,002	0,041	10
Macrophages without heating	1,04 (0,16; 1,65)*#	0,016	2,500	11
Macrophages with heating	0,05 (0,01; 0,91)	0,005	1,590	12
Tumor	1,41 (0,40; 1,50)*#	0,042	5,000	6

Me – median, 25% – the first quartile, 75% – the third quartile, Min – the minimum value in the sample, Max – the maximum value in the sample, N – the sample volume,* – the reliability of the difference when compared with the “drainage” group, # – the reliability of the difference when compared with the “mesothelium” group.

tures of ascites-associated macrophages before and after heating. (Fig. 1)

Based on the Kruskal-Wallis criteria calculation results, the reliability of the difference between groups for the TNF indicator was

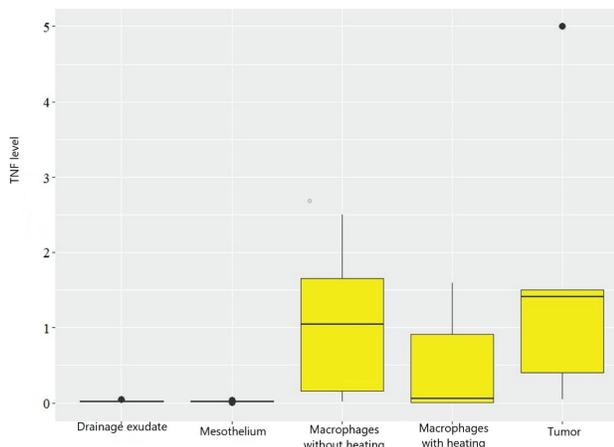


Figure 1. TNF concentrations in the supernatants of primary cultures of OC of peritoneal mesothelium, AAM, mesothelium, and peritoneal/ascites-associated macrophages

found ($p = 0.001$). In the a posteriori analysis using Dan’s test, the reliability of the difference in the pairs “macrophages without heating – drainage exudate” ($p = 0.03$), “tumor – drainage exudate” ($p = 0.02$), “macrophages – mesothelium” ($p = 0.04$), and “mesothelial – tumor” ($p = 0.03$) (Table 6).

According to the Kruskal-Wallis criteria calculation results, the reliability of the difference between groups for the TGF- β indicator was not disclosed ($p = 0.23$). Hence, no pairwise comparison was performed.

The results of experiments showed that the concentration of TNF was inclined to drop in supernatants of macrophage cultures after an hour of heating. A decrease was observed in 10 out of 12 cases. After heating, the average TNF concentration dropped from 1.06 to 0.48 ng/ml.

The concentration of TGF- β in macrophage cultures in the samples lowered too, but it occurred less frequently in 8 out of 12 cas-

Table 6

The concentration of cytokine TGF- β in biological fluids and supernatants of primary cultures of mesothelial, tumor cells, and ascites-associated macrophages with and without hyperthermia

Group	Me (25%; 75%)	Min	Max	N
Drainage exudate	0,55 (0,19; 2,84)	0,156	7,840	10
Mesothelium	1,25 (0,92; 2,49)	0,199	5,680	12
Macrophages without heating	1,76 (1,46; 2,09)	1,186	3,744	12
Macrophages with heating	0,92 (0,11; 1,84)	0,038	6,282	12
Tumor	0,50 (0,13; 1,44)	0,052	3,952	6

Me – median, 25% – the first quartile, 75% – the third quartile, Min – the minimum value in the sample, Max – the maximum value in the sample, N – sample size.

12 випадків і значення її після прогрівання коливалися у широких межах (від 0,03 до 6,28 нг/мл) (Рис. 2).

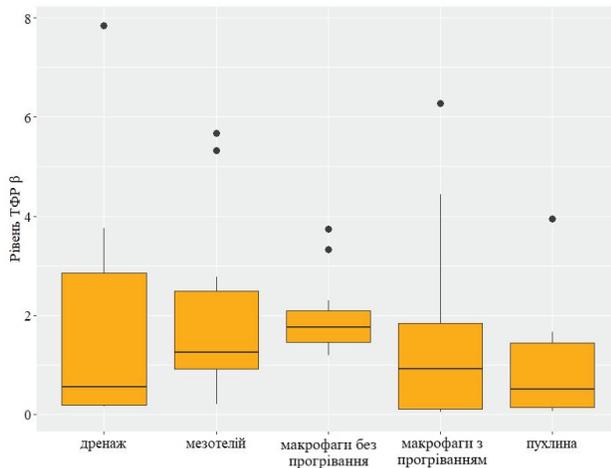


Рисунок 2. Концентрації ТФР- β у супернатантах первинних культур мезотелію, перитонеальних/асцитасоційованих макрофагів

Отримані нами дані демонструють вищі рівні активності ЧНП в мікрооточенні РЯ, асоційовані з гіршою чутливістю до хіміотерапії та рецидивуванням. Проте зростання прозапального пулу цитокінів в межах черевної порожнини забезпечується не тільки клітинами РЯ, але й ААМ. Саме вони сприяють виживанню ракових клітин після ХТ, формуванню хіміорезистентності (17). Цей феномен свого часу був названий «цитокінною підтримкою пухлинної прогресії перитонеальними макрофагами» (16). Результати нашого дослідження дозволяють припустити, що НІРЕС може ініціювати дефрагментацію цього патофізіологічного ланцюга.

Обговорення

Отримані нами результати підтверджують раніше відомі дані щодо регіонального впливу НІРЕС після циторедуктивної операції (19). Гіпертермічний компонент забезпечує збільшення глибини пенетрації та цитотоксичності ХТ. Проте в еру імунної терапії зростає інтерес до потенційних імуномодулюючих ефектів гіпертермії [21–23]. Отримані нами дані свідчать про зниження рівня прозапального ЧНП та ТФР- β в ексудаті з черевної порожнини після процедури НІРЕС. Причиною цього явища може бути не тільки видалення пухлинних мас-продуцентів цитокінів після циторедукції, але й зниження експресії ЧНП клі-

тинними компонентами внутрішньочеревного мікрооточення, зокрема макрофагами, під впливом годинної гіпертермії. Раніше нами було показано, що перитонеальні ААМ при РЯ за своїми властивостями подібні до ПАМ [9,16]. ПАМ/ААМ підтримують виживання ракових клітин, зокрема виділяють прозапальні цитокіни (ЧНП, IL-6), стимулюють неоангіогенез (VEGF), перетворюють TGF- β та виділяють IGF1, чим стимулюють проліферацію клітин, потенціюючи імплантацію пухлинних комплексів у черевній порожнині [24]. Останні роки ПАМ розглядаються як потенційна терапевтична мішень [25]. Отримані докази імуносупресивної участі ПАМ у регуляції механізмів дії контрольних точок PD-1/PD-L1 [25,26]. НІРЕС призводить до активації сигнальних шляхів, змін експресії генів як у залишкових пухлинних клітинах, так і в імунітах, індукуючи в останніх посилення експресії PD-1 [23]. Результати нашого дослідження вказують на опосередкований цитокін-модулюючий вплив високих температур на внутрішньочеревне мікрооточення при РЯ, що підтверджено в досліді *in vitro* з годинним прогріванням добової культури перитонеальних ААМ, отриманих від хворих на РЯ.

Wu С.С. та співавтори [27] використовували модель РЯ миші, щоб оцінити вплив гіпертермічної ХТ на імунні елементи пухлинного мікрооточення в черевній порожнині. Було встановлено, що гіпертермія не тільки сприяла нагромадженню М1- макрофагів та дендритних клітин у пухлинних локусах, але також зменшила кількість ракових стовбуроподібних клітин. Отже НІРЕС може сприяти розвитку адаптивної імунної відповіді, яка переважно націлена на стовбурові клітини при РЯ. Саме сплячі стовбурові клітини в популяції РЯ, які пережили хіміотерапію є джерелом розвитку рецидиву хвороби. НІРЕС може відігравати центральну роль в елімінації мінімальних залишкових пухлинних осередків після ад'ювантної хіміотерапії або при рецидиві РЯ [28]. Таким чином, НІРЕС має певний модулюючий вплив на імуноасоційовані компоненти внутрішньочеревного гомеостазу при РЯ, які опосередковано можуть визначати ефективність наступних етапів лікування. З'ясування більш конкретних молекулярних наслідків впливу НІРЕС на внутрішньочеревне мікрооточення потребує подальших досліджень.

es, and its values after heating varied widely (from 0.03 to 6.28 ng/ml). (Fig. 2)

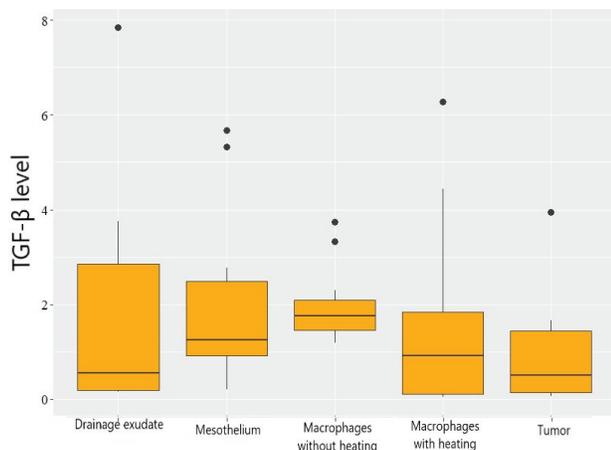


Figure 2. Concentrations of TGF- β in supernatants of primary cultures mesothelium, peritoneal/ascites-associated macrophages

Our findings show that higher levels of TNF activity in the OC microenvironment are related to bigger chemotherapy sensitivity and recurrence. However, AAM and ROC cells contribute to the expansion of the pro-inflammatory pool of cytokines within the abdominal cavity. They promote both the survival of cancer cells after ChT and the development of chemoresistance (17). This was originally referred to as “cytokine support of tumor progression by peritoneal macrophages” (16). Our findings show that HIPEC can initiate the defragmentation of this pathophysiological chain.

Discussion

Our findings support previously published research on the regional impact of HIPEC after cytoreductive surgery (19). The hyperthermic component increases the depth of penetration and cytotoxicity of ChT. However, in the age of immunological treatment, there is a growing interest in the potential immunomodulatory effects of hyperthermia [21–23]. We found a decrease in pro-inflammatory TNF and TGF- β levels in exudate from the abdominal cavity after the HIPEC procedure. The cause of this phenomenon could be the removal of tumor mass-producers of cytokines after cytoreduction and a decrease in TNF expression by intra-abdominal microenvironmental cellular components, particularly macrophages, under the influence of

hourly hyperthermia. We previously showed that peritoneal AAMs in OC are similar in their properties to TAMs [9,16]. TAM/AAM supports cancer cell survival by secreting pro-inflammatory cytokines (TNF, IL-6), increasing neoangiogenesis (VEGF), converting TGF- β and secreting IGF1, consequently stimulating cell proliferation and potentiating tumor complex implantation in the abdominal cavity [24]. In recent years, TAM has been considered a potential therapeutic target [25]. TAM was found to play an immunosuppressive role in modulating the mechanisms of action of PD-1/PD-L1 control points [25,26]. HIPEC activates signaling pathways and affects gene expression in both remaining tumor cells and immunocytes, increasing PD-1 expression in the latter [23]. The findings of this study show a mediated cytokine-modulating effect of high temperatures on the intra-abdominal microenvironment in OC, which was confirmed in an in vitro experiment with one-hour heating of a daily culture of peritoneal AAMs taken from patients with OC.

Wu C.C. et al. [27] used the OC mouse model to evaluate the effect of hyperthermic ChT on the immune elements of the tumor microenvironment in the abdominal cavity. It was found that hyperthermia not only stimulated the accumulation of M1-macrophages and dendritic cells in tumor loci but also reduced the number of cancer stem-like cells. Therefore, HIPEC can stimulate the development of an adaptive immune response primarily directed at OC stem cells. The primary cause of disease relapse is dormant stem cells in the OC population that have survived chemotherapy. HIPEC can play a central role in eliminating minimal residual tumor cells after adjuvant chemotherapy or in the recurrence of OC [28]. Thus, HIPEC has a certain modulating effect on immuno-associated components of intra-abdominal homeostasis in OC, which can indirectly determine the effectiveness of the next stages of treatment. More research is required to elucidate the more specific molecular consequences of HIPEC's effect on the intra-abdominal microenvironment.

In conclusions: It has been confirmed that the pro-inflammatory landscape of intra-abdominal homeostasis generated by cytokine activity, primarily TNF, is mostly formed by

У висновках: встановлено, що прозапальний ландшафт інтраабдомінального гомеостазу, зумовленого активністю цитокінів, зокрема ЧНП, формується переважно паракринною активністю ракових клітин та перитонеальних асцитасоційованих макрофагів.

Виявлено зниження концентрацій цитокінів ЧНП, ТФР- β у дренажному вмісті після НІРЕС у порівнянні з тими ж показниками в асцитичній рідині до операції.

Гіпертермія до 40°C протягом години у системі *in vitro* призводить до зниження експресії ЧНП в добовій культурі зрілих перитонеальних/асцитасоційованих макрофагів, отриманих від хворих з рецидивним РЯ.

Клінічна чутливість до системної хімотерапії та тривалість безрецидивного періоду понад 12 місяців асоційована зі зниженням експресії ЧНП в супернатантах первинних клітинних культур рецидивного РЯ.

Подяка: автори висловлюють вдячність професору Сушельницькому С. І. за багаторічну співпрацю і участь в обговоренні результатів дослідження.

Заява про інформовану згоду: дослідження було схвалено локальною етичною комісією Львівського регіонального онкоцентру. Кожна з пацієток ознайомила з інформованою згодою та підписала її.

Додаток

Таблиця 5.1

Перевірка нормальності для ЧНП

Групи	P	Асиметрія	Ексцес
Дренаж	0,305	1,05	1,44
мезотелій	0,960	0,07	0,26
макрофаги з прогріванням	0,284	0,13	-1,28
макрофаги без прогріванням	0,004	0,80	-1,10
Пухлина	0,050	1,69	3,42

P – точне значення за результатами обрахунку критерію Шапіро-Уїлка

Таблиця 5.2

Перевірка нормальності для ТФР- β

Групи	p	Асиметрія	Ексцес
Дренаж	0,003	1,80	3,26
Мезотелій	0,014	1,36	0,89
макрофаги з прогріванням	0,020	1,46	1,41
макрофаги без прогріванням	0,007	1,63	2,16
Пухлина	0,043	1,71	2,74

P – точне значення за результатами обрахунку критерію Шапіро-Уїлка

cancer cells and peritoneal ascites-associated macrophages. TNF and TGF- β concentrations in the drainage exudate have been lower after HIPEC compared to the same parameters in the ascitic fluid before the surgery. Hyperthermia up to 40°C for one hour in an in vitro system leads to a decrease in the expression of TNF in a daily primary culture of peritoneal/ascites-associated macrophages obtained from patients with recurrent OC.

Clinical sensitivity to systemic chemotherapy and a relapse-free period of more than 12 months are related to decreased TNF expres-

sion in recurrent OC primary cell culture supernatants.

Acknowledgments: The authors express their deep gratitude to Professor Serhiy Souchelnyskyi for long-term cooperation, support and involvement in discussing the study results.

Informed Consent Statement: The study was approved by the local ethics committee of the Lviv Regional Cancer Centre. Each patient reviewed a consent form and signed it.

Appendix

Table 5.1

Normality check for TNF

Group	P	Asymmetry	Excess
Drainage	0,305	1,05	1,44
Mesothelium	0,960	0,07	0,26
Macrophages with heating	0,284	0,13	-1,28
Macrophages without heating	0,004	0,80	-1,10
Tumor	0,050	1,69	3,42

Table 5.2

Normality check for TGF- β

Group	p	Asymmetry	Excess
Drainage	0,003	1,80	3,26
Mesothelium	0,014	1,36	0,89
Macrophages with heating	0,020	1,46	1,41
Macrophages without heating	0,007	1,63	2,16
Tumor	0,043	1,71	2,74

References

1. Timmermans M, Sonke GS, Vijver KKV de, Aa MA van der, Kruitwagen RFP. No improvement in long-term survival for epithelial ovarian cancer patients: A population-based study between 1989 and 2014 in the Netherlands. *Eur J Cancer* 2018;88:31–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.10.030>.
2. Reid BM, Permut JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* 2017;14:9–32. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>.
3. Antonio CCP, Alida GG, Elena GG, Rocío GS, Jerónimo MG, Luis ARJ, et al. Cytoreductive Surgery With or Without HIPEC After Neoadjuvant Chemotherapy in Ovarian Cancer: A Phase 3 Clinical Trial. *Ann Surg Oncol* 2022;29:2617–25. <https://doi.org/10.1245/s10434-021-11087-7>.
4. Van Driel WJ, Koole SN, Sikorska K, SchagenvanLeeuwen JH, Schreuder HWR, Hermans RHM, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2018;378:230–40. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708618>.
5. Koole SN, van Stein RM, Sikorska K, Barton DP, Perrin L, Brennan D, et al. Primary cytoreductive surgery with or without hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for FIGO stage III epithelial ovarian cancer: OVHIPEC-2, a phase III randomized clinical trial. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc* 2020;30:888–92. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-001231>.
6. Van Stein RM, Lok CAR, Aalbers AGJ, H J T de Hingh I, Houwink API, Stoevelaar HJ, et al. Standardizing HIPEC and perioperative care for patients with ovarian cancer in the Netherlands using a Delphi-based consensus. *Gynecol Oncol Rep* 2022;39:100945. <https://doi.org/10.1016/j.gore.2022.100945>.
7. Grimmig T, Moll E-M, Kloos K, Thumm R, Moench R, Callies S, et al. Upregulated Heat Shock Proteins After Hyperthermic Chemotherapy Point to Induced Cell Survival Mechanisms in Affected Tumor Cells From Peritoneal Carcinomatosis. *Cancer Growth Metastasis* 2017;10:1179064417730559. <https://doi.org/10.1177/1179064417730559>.
8. Pelz JOW, Vetterlein M, Grimmig T, Kerscher AG, Moll E, Lazariotou M, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis: role of heat shock proteins and dissecting effects of hyperthermia. *Ann Surg Oncol* 2013;20:1105–13. <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2784-6>.
9. Franko J, Brahmhatt R, Tee M, Raman S, Ferrel B, Gorvet M, et al. Cellular Immunoprofile of Peritoneal Environment During a HIPEC Procedure. *Ann Surg Oncol* 2020;27:5005–13. <https://doi.org/10.1245/s10434-020-08870-3>.
10. Gordillo CH, Sandoval P, Muñoz-Hernández P, Pascual-Antón L, López-Cabrera M, Jiménez-Heffernan JA. Mesothelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to the Generation of Carcinoma-Associated Fibroblasts in Locally Advanced Primary Colorectal Carcinomas. *Cancers* 2020;12:499. <https://doi.org/10.3390/cancers12020499>.
11. Pascual-Antón L, Cardeñes B, Sainz de la Cuesta R, González-Cortijo L, López-Cabrera M, Cabañas C, et al. Mesothelial-to-Mesenchymal Transition and Exosomes in Peritoneal Metastasis of Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22:11496. <https://doi.org/10.3390/ijms222111496>.
12. Terri M, Trionfetti F, Montaldo C, Cordani M, Tripodi M, Lopez-Cabrera M, et al. Mechanisms of Peritoneal Fibrosis: Focus on Immune Cells–Peritoneal Stroma Interactions. *Front Immunol* 2021;12.
13. Katz S, Zsiros V, Kiss AL. Under inflammatory stimuli mesenteric mesothelial cells transdifferentiate into macrophages and produce pro-inflammatory cytokine IL-6. *Inflamm Res* 2019;68:525–8. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01247-7>.
14. Li J, Guo T. Role of Peritoneal Mesothelial Cells in the Progression of Peritoneal Metastases. *Cancers* 2022;14:2856. <https://doi.org/10.3390/cancers14122856>.
15. Nowak M, Klink M. The Role of Tumor-Associated Macrophages in the Progression and Chemoresistance of Ovarian Cancer. *Cells* 2020;9:1299. <https://doi.org/10.3390/cells9051299>.
16. Volod'ko N. Метастазування злоякісних пухлин: роль факторів пухлинного мікроточення. 2002.
17. El-Arabey AA, Alkhalil SS, Al-Shouli ST, Awadalla ME, Alhamdi HW, Almanaa TN, et al. Revisiting macrophages in ovarian cancer microenvironment: development, function and interaction. *Med Oncol Northwood Lond Engl* 2023;40:142. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-01987-x>.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
19. Meager A. Assays for transforming growth factor beta. *J Immunol Methods* 1991;141:1–14. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90204-s](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90204-s).
20. Valle SJ, Alzahrani NA, Liauw W, Sugarbaker PH, Bhatt A, Morris DL. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) Methodology, Drugs and Bidirectional Chemotherapy. *Indian J Surg Oncol* 2016;7:152–9. <https://doi.org/10.1007/s13193-016-0498-0>.
21. Ceelen W, Demuytere J, de Hingh I. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy: A Critical Review. *Cancers* 2021;13:3114. <https://doi.org/10.3390/cancers13133114>.

22. Chang M, Hou Z, Wang M, Li C, Lin J. Recent Advances in Hyperthermia Therapy-Based Synergistic Immunotherapy. *Adv Mater Deerfield Beach Fla* 2021;33:e2004788. <https://doi.org/10.1002/adma.202004788>.
23. Dellinger TH, Han ES, Raoof M, Lee B, Wu X, Cho H, et al. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy-Induced Molecular Changes in Humans Validate Preclinical Data in Ovarian Cancer. *JCO Precis Oncol* 2022;6:e2100239. <https://doi.org/10.1200/PO.21.00239>.
24. Zhang Y, Ouyang D, Chen YH, Xia H. Peritoneal resident macrophages in tumor metastasis and immunotherapy. *Front Cell Dev Biol* 2022;10:948952. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.948952>.
25. Duan Z, Luo Y. Targeting macrophages in cancer immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6:127. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00506-6>.
26. Pu Y, Ji Q. Tumor-Associated Macrophages Regulate PD-1/PD-L1 Immunosuppression. *Front Immunol* 2022;13.
27. Wu C-C, Hsu Y-T, Chang C-L. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy enhances antitumor effects on ovarian cancer through immune-mediated cancer stem cell targeting. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group* 2021;38:1013–22. <https://doi.org/10.1080/02656736.2021.1945688>.
28. Yang W, Kim D, Kim DK, Choi KU, Suh DS, Kim JH. Therapeutic Strategies for Targeting Ovarian Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2021;22:5059. <https://doi.org/10.3390/ijms22105059>.