

ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИЙ РЕЗЕРВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ И ИНВАЗИВНОГО ПРОТОКОВОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ

**Архипов С.А.¹, Михайлова Е.С.², Кунц Т.А.¹, Карпущина К.В.²,
Могильная Е.Д.¹, Соловьев К.А.¹, Вараксин Н.А.³, Аутеншлюс А.И.^{1,2}**

¹ ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» г. Новосибирск, Россия

² Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Новосибирск, Россия

³ Закрытое акционерное общество «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи между цитокинпродуцирующим резервом инвазивного протокового рака молочной железы и его микроокружения, с цитокинпродуцирующим резервом иммунокомпетентных клеток крови, а также с патогистологическими и иммуногистохимическими характеристиками рака молочной железы. С помощью ИФА исследовали спонтанный и стимулированный поликлональными активаторами цитокинпродуцирующий резерв ИКК периферической крови и биоптатов инвазивного протокового рака молочной железы (аденокарцинома) 34 женщин, значения которого выражали с помощью индекса влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию цитокинов (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1ra, TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1). Иммуногистохимическим методом исследовали в биоптатах опухоли экспрессию VEGF-A, рецепторов ER, PR и маркера пролиферации Ki-67. ИВПА ИКК крови на продукцию исследованных цитокинов в большинстве случаев, за исключением IL-18, IL-1 β и MCP-1, был более высоким по сравнению с ИВПА на продукцию цитокинов опухолью и ее микроокружением. Только ИВПА на продукцию провоспалительного и «проонкогенного» цитокина IL-18 клетками опухоли и ее микроокружением был повышен по сравнению с ИВПА на продукцию этого цитокина ИКК крови. Изучение сопряженности ИВПА на продукцию цитокинов в супернатанте опухоли, с ИВПА на экспрессию VEGF-A в опухоли, с патогистологическими параметрами и экспрессией эстрогена, прогестерона и маркера пролиферации Ki-67, позволило выявить, прямую

Адрес для переписки:

Архипов Сергей Алексеевич
ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный
медицинский университет»
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.
Тел.: 8 (383) 226-35-60.
E-mail: arhipowsergei@yandex.ru

Address for correspondence:

Arkhipov Sergey A.
Novosibirsk State Medical University
630091, Russian Federation, Novosibirsk, Krasny ave, 52.
Phone: 7 (383) 226-35-60.
E-mail: arhipowsergei@yandex.ru

Образец цитирования:

С.А. Архипов, Е.С. Михайлова, Т.А. Кунц, К.В. Карпущина, Е.Д. Могильная, К.А. Соловьев, Н.А. Вараксин, А.И. Аутеншлюс «Цитокинпродуцирующий резерв иммунокомпетентных клеток крови и инвазивного протокового рака молочной железы, его взаимосвязь с патогистологическими и иммуногистохимическими параметрами злокачественного новообразования» // *Медицинская иммунология*, 2016. Т. 18, № 5. С. 459-468. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-459-468

For citation:

S.A. Arkhipov, E.S. Mikhailova, T.A. Kunts, K.V. Karpukhina, E.D. Mogilnaya, K.A. Solovyev, N.A. Varaksin, A.I. Autenshlyus "Cytokine-producing reserve of immunocompetent cells from blood and invasive ductal breast cancer tissues: its correlation with histopathological and immunohistochemical parameters of malignant neoplasia", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 459-468. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-459-468

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-459-468>

© Архипов С.А. и соавт., 2016

корреляционную связь между исследуемыми показателями. Высокая положительная корреляционная связь была получена между ИВПА на продукцию опухоли и ее микроокружением TNF α и степенью васкуляризации опухоли. Выявлена отрицательная корреляционная связь между ИВПА IL-6, между MCP-1 и маркером пролиферативной активности клеток Ki-67. Выявлена прямая корреляционная связь между соотношением ИВПА на продукцию ИКК крови IL-1ra и IL-1 β (IL-1ra / IL-1 β) и ИВПА на экспрессию VEGF-A аденокарциномой и ее микроокружением, что свидетельствует о взаимосвязи продукции IL-1ra ИКК с экспрессией VEGF-A. Было выявлено несколько пересекающихся, разветвляющихся и даже замыкающихся в «круг» цепей корреляционных связей: VEGF-A (иммуногистохимический показатель экспрессии по ИВПА) – IL-10 (ИВПА на продукцию в супернатанте) – IL-8 (ИВПА на продукцию в супернатанте) – MCP-1 (ИВПА на продукцию в супернатанте) – IL-6 (ИВПА на продукцию в супернатанте) – IL-10 (ИВПА на продукцию в супернатанте) – VEGF-A (иммуногистохимический показатель экспрессии по ИВПА). В результате проведенного исследования определены взаимосвязи цитокинпродуцирующих резервов опухоли, выявленных при воздействии ПА на ИПР с процессами, протекающими в самой опухоли, оцениваемых по патогистологическим и иммуногистохимическим параметрам. Полученные данные свидетельствуют о сложных механизмах, опосредованных цитокинами, обеспечивающими инвазивный рост злокачественной опухоли.

Ключевые слова: поликлональные активаторы, цитокины, иммунокомпетентные клетки крови, рак молочной железы

CYTOKINE-PRODUCING RESERVE OF IMMUNOCOMPETENT CELLS FROM BLOOD AND INVASIVE DUCTAL BREAST CANCER TISSUES: ITS CORRELATION WITH HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PARAMETERS OF MALIGNANT NEOPLASIA

Arkhipov S.A.^a, Mikhailova E.S.^b, Kunts T.A.^a, Karpukhina K.V.^b,
Mogilnaya E.D.^a, Solovyev K.A.^a, Varaksin N.A.^c, Autenshlyus A.I.^{a, b}

^a Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^b Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

^c Closed Joint Stock Company "Vector-Best", Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to investigate a relationship between cytokine-producing reserve of invasive ductal cancer cells and its microenvironment, and cytokine-producing reserve of immunocompetent blood cells (IBC), as well as with histopathological and immunohistochemical characteristics of breast cancer. Using ELISA method we investigated the spontaneous and stimulated with polyclonal activators (PA) cytokine-producing reserve of IBC and biopsy specimens from invasive ductal cancer (adenocarcinoma) in 34 women. Appropriate values were expressed by the Influence Index of polyclonal activators (IIPA) upon cytokine production (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1ra, TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1). In tumor biopsies, we studied expression of VEGF-A, estrogen receptor, progesteron receptor and pro-proliferation marker Ki-67 by means of immunohistochemical method. Activation values of blood IBC in most cases, except of IL-18, IL-1 β and MCP-1, were higher than appropriate effects upon cytokine production by tumor tissues. Meanwhile, the IIPA activation index upon IL-18 (a proinflammatory and prooncogene cytokine) production by tumor cells and its microenvironment proved to be elevated, as compared to appropriate IIPA by the blood IBC. Statistical studies showed a direct correlation between IIPA and cytokine production in tumor supernates, IIPA of VEGF-A expression in tumor tissue, with pathohistological parameters and expression of estrogen and progesterone receptors and Ki-67 proliferation marker. A high positive correlation was obtained between IIPA TNF α production by the tumor tissue, and degree of tumor vascularization.

We have revealed a negative correlation between IIPA for IL-6, MCP-1 and Ki-67 marker of cell proliferation. A direct correlation was found between IIPA values for IL-1ra/IL-1 β production ratios in blood cells, and IIPA for VEGF-A expression in adenocarcinoma tissues, thus indicating to probable connections

between IL-1ra production by IBC and VEGF-A expression. We have discerned several intersecting, diverging, and even circle-closed correlative chains of correlation, e.g.: VEGF-A (immunohistochemical marker of IPA expression) – IL-10 and IL-8 (IPA for supernate products); MCP-1, IL-6, and IL-10 (IPA for supernate products)– VEGF-A (immunohistochemical indicator of expression for IPA). The results of this study suggest a relationship between cytokine-producing reserves of the tumor identified by appropriate PA correlations with the processes occurring in malignant tumors, as assessed by histopathological and immunohistochemical parameters. The data are indicative for some complex mechanisms mediated by cytokines which provide invasive growth of malignant tumor.

Keywords: polyclonal activators, cytokines, blood immunocompetent cells, breast cancer

Введение

Цитокины относят к одним из центральных регуляторов иммунного гомеостаза, которые играют важную роль в противоопухолевой защите организма человека [4, 12, 14]. Вместе с тем известно, что иммунная система человека обладает способностью продуцировать факторы, осуществляющие не только иммунный надзор, препятствующий появлению в организме атипических клеток, но и стимулирующие рост и прогрессию опухоли [5, 12, 20, 22].

Согласно одной из современных концепций опухолевого роста, роль цитокинов в канцерогенезе складывается из ряда сложных взаимодействий между ними, приводящих к дисрегуляции сформированной цитокиновой сети [4, 11]. Нарушение функционирования этой сети является одним из условий развития злокачественных новообразований [30], при которых цитокины становятся патогенетическими факторами опухолевой прогрессии [5, 6, 10]. Показано, например, что IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-1 α и его рецепторный антагонист IL-1ra способны продуцироваться опухолевыми клетками и проявляют себя как факторы, активирующие ангиогенез, усиливающие инвазию и миграцию опухолевых клеток, а TNF α , являясь индуктором апоптоза и неоангиогенеза, может вызывать усиление гибели лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль и способствовать пролиферации и распространению опухолевых клеток в организме [1, 12]. Показано, что цитокин IL-18, относящийся к семейству интерлейкина 1 (IL-1), может обладать как провоспалительным, так и «проонкогенным» действием [12, 22].

В процессе роста опухоли ее клетки находятся в постоянном взаимодействии между собой, с клетками стромы опухоли (фибробластами, тучными клетками, дендритными клетками и др.), с иммунокомпетентными клетками, инфильтрирующими опухоль, а также с транзиторными клетками, преимущественно иммунной системы, которые постоянно рециркулируют по сосудистой сети опухоли и всего организма-

опухоленосителя. При этом неоангиогенез, на основе уже существующей в ткани сети сосудов, является необходимым условием для роста опухоли, а высокая степень васкуляризации обеспечивает инвазивный рост опухоли [1, 3, 15, 18].

Существует точка зрения, что при злокачественном новообразовании цитокины взаимодействуют в рамках двух систем: «опухоль – цитокины» и «иммунная система – цитокины» [3, 12, 20]. Согласно данным, представленным в ряде работ, изменения цитокинпродуцирующей активности иммунокомпетентных клеток, выявленные при злокачественных новообразованиях, возможно, являются одним из главных факторов нарушения противоопухолевой защиты организма [5, 7, 9, 23], что обуславливает необходимость проведения исследований в этом направлении, которые бы учитывали как минимум цитокинпродуцирующий резерв опухолевых клеток и их микроокружения (клеток рыхлой соединительной ткани опухоли; иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих ткань опухоли; мезенхимальных стволовых клеток, мигрирующих в опухоль и др.), а также цитокинпродуцирующий резерв иммунокомпетентных клеток крови (ИКК).

Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи между цитокинпродуцирующим резервом инвазивного протокового рака молочной железы и его микроокружения, с цитокинпродуцирующим резервом иммунокомпетентных клеток крови, а также с патогистологическими и иммуногистохимическими характеристиками рака молочной железы.

Материалы и методы

Материалом исследования служила периферическая кровь и биоптаты инвазивного протокового рака молочной железы, являющимся по гистологическому типу аденокарциномой, 34 женщин в возрасте от 45 до 60 лет. Для оценки цитокинпродуцирующего резерва ИКК крови, опухоли и ее микроокружения применяли комплекс поликлональных активаторов (ПА),

состоящий из фитогемагглютинаина в концентрации 4 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида в концентрации 2 мкг/мл. В исследовании использовали стандартизованный набор реагентов «Цитокин-стимул-бест» производства ЗАО «Вектор-Бест». Одну часть клеток крови пациента инкубировали в питательной среде DMEM-F12 (для определения спонтанной продукции), а другую – в таком же объеме среды с комплексом ПА для определения индуцированной продукции цитокинов при 37 °С в течение 24 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 15 мин, получали супернатант, в котором проводили определение концентрации цитокинов. Биоптаты опухолей, полученные методом трепанобиопсии [2] объемом 8 мм³, получали специальным устройством и помещали в 2 флакона, в одном из которых находилась только питательная среда DMEM-F12 (спонтанная продукция), а в другом – раствор ПА в таком же объеме среды (продукция, индуцированная ПА). После инкубирования при 37 °С в течение 72 ч опухоль извлекали из среды и фиксировали в растворе формалина для дальнейших иммуногистохимических и патогистологических исследований. Для получения очищенного от клеток супернатанта оставшиеся клетки опухоли осаждали центрифугированием при 2000 об/мин 15 мин. В супернатантах после осаждения клеток крови и опухоли с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию следующих цитокинов: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1 α , TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1 (монокитарный хемотаксический протеин-1) с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест». Индекс влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию цитокинов опухолью и ИКК крови, а также клетками ее микроокружения высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А – уровень стимулированной поликлональными активаторами продукции цитокина, Б – уровень спонтанной продукции цитокина.

Для определения потенциальной способности опухоли к экспрессии VEGF-A иммуногистохимическим методом, биоптаты, фиксированные в нейтральном формалине, дегидратировали и заливали в парафин. Депарафинизацию и регидратацию препаратов проводили по стандартной методике через батарею реагентов (ксилола и спиртов) в определенной последовательности (по 3 мин в каждой порции жидкости). Срезы помещали в раствор тритона X-100 на 5 минут для демаскировки VEGF-A. Для блокирования

эндогенной пероксидазы срезы выдерживали в 1% водном растворе H₂O₂ в течение 5 мин. Снижение неспецифического окрашивания проводили обработкой срезов нормальной блокирующей неиммунной сывороткой (из набора VECTASTAIN Elite ABC Kit, США) в течение 10 мин. После чего их инкубировали в течение 1 часа с первыми антителами, специфичными в отношении: VEGF-A (поликлональные кроличьи, Кат. ном. – RB-9031-P, Thermo Scientific, США), Ki-67 (моноклональные кроличьи, Кат. ном. – 790-4286, Ventana Medical System Inc. – «Ventana», США); anti-Estrogen Receptor (ER, SP1) (моноклональные кроличьи, Кат. ном. – 790-4325, «Ventana», США); anti-Progesterone Receptor (PR, 1E2; моноклональные кроличьи, Кат. ном. – 790-4296, «Ventana», США) в конечном разведении 2,5 мкг/мл (в растворе для разведения антител – BD, Cat.n. 559148), после чего инкубировали в течение 30 мин со вторыми биотинилированными антителами (VECTASTAIN Elite ABC Kit, США). Далее проводили инкубацию с авидин-пероксидазным комплексом (VECTASTAIN Elite ABC Kit, США) в течение 30 мин и в хромогенном субстрате, содержащем диаминобензидин, в течение 5 мин. Срезы докрашивали гематоксилином, промывали водой и после дегидратации заключали в бальзам.

Индекс влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на экспрессию VEGF-A биоптатами опухолей рассчитывали по вышеуказанной формуле ИВПА = А/Б, где А представлял собой показатель экспрессии VEGF-A, определяемый иммуногистохимическим методом, после стимуляции биоптата поликлональными активаторами, а Б – показатель спонтанной экспрессии VEGF-A, определяемый также иммуногистохимическим методом. ИВПА выражали в условных единицах. Иммуногистохимический показатель экспрессии VEGF-A выражали в % окрашенной зоны цифрового изображения исследуемого среза. Фотографирование гистологических препаратов, окрашенных на VEGF-A, выполняли с использованием системы анализа изображений на базе микроскопа Micros MC 300A, цифровой камеры CX 13c («Baumer», Германия). Количественную оценку интенсивности экспрессии VEGF-A выполняли с использованием программного обеспечения ImageJ 1.5 (Национальный институт здоровья, США).

Патогистологическое исследование фиксированных опухолей проводилось патоморфологом на препаратах, окрашенных по стандартной методике гематоксилином и эозином. Патогистологические параметры характеризовали в баллах,

возрастающих от меньшей до большей степени выраженности признака.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Показатели выражали в виде медианы – Me, нижнего и верхнего процентилей ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$), рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r) и его достоверность (p).

Результаты

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что ИВПА ИКК крови на продукцию исследованных цитокинов в большинстве случаев, за исключением IL-18, IL-1 β и MCP-1, был более высоким по сравнению с ИВПА на продукцию цитокинов опухолью и ее микроокружением. Только ИВПА на продукцию провоспалительно-

го и «проонкогенного» цитокина IL-18 клетками опухоли и ее микроокружением был повышен по сравнению с ИВПА на продукцию этого цитокина ИКК крови. Представленные в таблице данные соотношения ИВПА на продукцию IL-1 β к ИВПА на продукцию рецепторного антагониста IL-1ra при раке молочной железы были более высокими по сравнению с ИКК крови, что достигалось за счет более низких значений ИВПА на продукцию рецепторного антагониста IL-1ra клетками опухоли и ее микроокружения.

Рассматривая экспрессию VEGF-A в аденокарциноме после инкубации с ПА необходимо отметить, что инкубация с ПА не оказывала влияния на экспрессию VEGF-A, что также подтверждалось незначительным приростом ИВПА (табл. 2).

ТАБЛИЦА 1. ИНДЕКСЫ ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЕЕ МИКРООКРУЖЕНИЕМ

ИВПА*	Исследуемые образцы	
	периферическая кровь	опухоль
	Me ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$)	Me ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$)
IL-2	13,43 (5,86; 16,19); p = $3,1 \times 10^{-8}$	1,86 (0,82; 3,59)
IL-6	44,22 (12,77; 121,66); p = $2,5 \times 10^{-12}$	2,27 (0,99; 2,74)
IL-8	15,66 (4,64; 35,14); p = $1,2 \times 10^{-8}$	1,40 (0,69; 2,56)
IL-10	29,97 (15,89; 58,06); p = $1,2 \times 10^{-11}$	1,21 (0,65; 2,06)
IL-17	28,19 (10,62; 60,59); p = $4,4 \times 10^{-10}$	1,00 (0,71; 3,00)
IL-18	1,16 (1,10; 1,34); p = $7,4 \times 10^{-5}$	1,92 (1,34; 1,42)
IL-1 β	15,85 (10,54; 32,67)	13,54 (7,99; 40,05)
IL-1ra	10,85 (6,51; 14,38); p = $2,8 \times 10^{-7}$	2,70 (1,89; 7,53)
TNF α	69,08 (28,50; 151,31); p = $2,9 \times 10^{-11}$	3,77 (1,07; 9,53)
IFN γ	540,85 (240,26; 713,46); p = $1,3 \times 10^{-12}$	1,50 (0,94; 3,11)
G-CSF	40,80 (15,79; 147,20); p = $2,9 \times 10^{-12}$	1,33 (0,98; 2,09)
GM-CSF	13,10 (6,11; 29,09); p = $1,1 \times 10^{-4}$	3,87 (1,16; 10,30)
VEGF-A	2,23 (1,71; 3,36); p = $6,7 \times 10^{-11}$	0,50 (0,34; 0,83)
MCP-1	1,05 (0,41; 4,78)	1,09 (0,43; 2,34)
IL-1 β /IL-1ra	1,70 (1,11; 3,29); p = $1,2 \times 10^{-3}$	6,92 (1,72; 18,46)

Примечание. * – индекс влияния поликлональных активаторов.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АКТИВАТОРАМИ ЭКСПРЕССИИ VEGF-A В ОБРАЗЦАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Показатели экспрессии VEGF-A	Me ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$)
Спонтанная экспрессия VEGF-A (иммуногистохимический показатель)	7,70 (3,89; 9,37)
Индукцированная ПА* экспрессия VEGF-A (иммуногистохимический показатель)	7,02 (3,69; 10,29)
ИВПА** на экспрессию VEGF-A	1,25 (0,74; 1,96)

Примечание. * – поликлональные активаторы; ** – индекс влияния поликлональных активаторов.

Изучение сопряженности ИВПА на продукцию цитокинов в супернатанте опухоли с ИВПА на экспрессию VEGF-A в самой опухоли, с патогистологическими параметрами и экспрессией эстрогена, прогестерона и маркера пролиферации Ki-67 позволило выявить, за редким исключением, прямую корреляционную связь между представленными в таблице 3 показателями. Наиболее высокая положительная корреляционная связь была получена между ИВПА на продукцию аденокарциномой и ее микроокружением TNF α и степенью васкуляризации опухоли, что подтверждало роль TNF α в стимуляции ее ангиогенеза. Кроме этого, только относительное содержание умеренно дифференцированных клеток находилось в прямой корреляционной связи с такими ключевыми факторами роста, как G-CSF и GM-CSF, а также с IL-1ra, который, как известно, контролирует опухолевый рост, модифицирует

строму опухоли и определяет доминирование тех или иных по дифференцировке клеток в опухоли [17]. Что касается корреляционных связей между ИВПА на продукцию цитокинов в супернатанте опухоли, между ИВПА на экспрессию VEGF-A в аденокарциноме и иммуногистохимическими показателями экспрессии эстрогена, прогестерона и маркера пролиферации Ki-67, оказалось, что наиболее выраженной была отрицательная корреляционная связь между ИВПА IL-6, между MСP-1 и маркером пролиферативной активности клеток Ki-67, что характерно для низкодифференцированного варианта опухоли.

Корреляционные связи между ИВПА на продукцию цитокинов в супернатанте опухоли и ИВПА на экспрессию в ней VEGF-A отличались от аналогичных показателей, полученных при исследовании ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови и ИВПА на экспрессию VEGF-A

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ИВПА* НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИВПА НА ЭКСПРЕССИЮ В НЕЙ VEGF-A, С ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ И ЭКСПРЕССИЕЙ ЭСТРОГЕНА, ПРОГЕСТЕРОНА И МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67

Исследуемые параметры	Коэффициент корреляции r (p)	Исследуемые параметры	Коэффициент корреляции r (p)
ИВПА IL-1ra – относительное содержание умеренно дифференцированных клеток	0,545 (0,006)	ИВПА IL-2 – ИВПА VEGF-A	0,465 (0,022)
		ИВПА IL-10 – ИВПА VEGF-A	0,450 (0,027)
ИВПА G-CSF – относительное содержание умеренно дифференцированных клеток	0,415 (0,044)	ИВПА G-CSF – ER	0,522 (0,009)
ИВПА GM-CSF – относительное содержание умеренно дифференцированных клеток	0,415 (0,044)	ИВПА G-CSF – PR	0,569 (0,011)
ИВПА TNF α – степень васкуляризации опухоли	0,620 (0,001)	ИВПА MСP-1 – ER	0,467 (0,022)
		ИВПА MСP-1 – PR	0,495 (0,031)
		ИВПА MСP-1 – Ki-67	-0,577 (0,01)
		ИВПА IL-6 – Ki-67	-0,712 (0,001)

Примечание. * – индекс влияния поликлональных активаторов.

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ИВПА* НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИКК КРОВИ С ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ И ИВПА НА ЭКСПРЕССИЮ VEGF-A АДЕНОКАРЦИНОМой МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЕЕ МИКРООКРУЖЕНИЕМ**

Исследуемые параметры		Коэффициент корреляции – r (p)
Супернатант ИВПА*	Патогистологические характеристики опухоли	
IL-1ra / IL-1 β	ИВПА на экспрессию VEGF-A (иммуногистохимический показатель)	0,445 (0,029)
VEGF-A	Количество патмитозов	-0,482 (0,017)
VEGF-A	Количество лимфатических узлов с метастазами	-0,524 (0,009)
MСP-1	Количество митозов	-0,440 (0,032)
IL-17	Показатель инфильтрации макрофагами	0,411 (0,046)

Примечание. * – индекс влияния поликлональных активаторов; ** – иммунокомпетентные клетки.

ТАБЛИЦА 5. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ИВПА* НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЕЕ МИКРООКРУЖЕНИЯ

ИВПА на продукцию цитокинов		Коэффициент корреляции – r (p)
IL-10	IL-2	0,677 (0,0001)
IL-2	IL-17	0,388 (0,05)
IL-10	IL-8	0,384 (0,025)
IL-8	IL-6	0,837 (0,0001)
IL-8	IL-1ra	0,393 (0,022)
IL-8	G-CSF	0,735 (0,0001)
IL-8	GM-CSF	0,672 (0,0001)
IL-8	MCP-1	0,709 (0,0001)
MCP-1	IL-6	0,732 (0,0001)
IL-6	IL-10	0,343 (0,047)

Примечание. * – индекс влияния поликлональных активаторов.

опухолью (табл. 3, 4). Выявлена прямая корреляционная связь между соотношением ИВПА на продукцию ИКК крови IL-1ra и IL-1 β (IL-1ra/IL-1 β) и ИВПА на экспрессию VEGF-A аденокарциномой и ее микроокружением, что свидетельствовало о взаимосвязи продукции IL-1ra ИКК крови с экспрессией VEGF-A.

Для определения сопряженности цитокин-продуцирующих резервов опухоли, выявленных при воздействии ПА на ИПР молочной железы, с процессами, протекающими в самой опухоли, оцениваемых по патогистологическим и иммуногистохимическим параметрам, нами было проведено исследование корреляционных связей между величинами ИВПА на продукцию различных цитокинов в супернатанте опухоли (табл. 5). Важно отметить, что в нашем исследовании была выявлена корреляционная связь между ИВПА на продукцию IL-10 и на продукцию IL-6 опухолью и ее микроокружением. В свою очередь, ИВПА на продукцию IL-6 находился в прямой корреляционной связи с ИВПА на продукцию IL-8, а также с экспрессией в опухоли Ki-67.

Обсуждение

Ранее было показано, что индекс влияния ПА, в частности ФГА, на продукцию клетками крови IL-6 повышался при низкодифференцированном варианте опухоли [12]. Поскольку в нашем случае преобладали умеренно дифференцированные варианты опухоли, то это, скорее всего, объясняет полученную отрицательную корреляционную связь между ИВПА на продукцию IL-6 и экспрессией в опухоли Ki-67.

Как известно, роль MCP-1 в развитии опухоли противоречива. С одной стороны, СС хемокины, к которым относится MCP-1, стимулируют

продукцию протеаз опухолевыми клетками и макрофагами, что может вызвать миграцию и пролиферацию опухолевых клеток. При этом низкоуровневая экспрессия MCP-1 способствует развитию опухоли. С другой – высокий уровень экспрессии этого хемокина вызывает торможение роста опухоли, что связывают с участием дендритных клеток и активацией специфического иммунитета [12]. Обратная корреляционная связь, выявленная нами между ИВПА на продукцию MCP-1 ИКК крови и патмитозами, вероятно, объясняется противоречивостью его функций при опухолевой прогрессии. Что касается корреляционной связи между ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови IL-17 и макрофагальной инфильтрации опухоли, то можно предположить, исходя из функций этого цитокина, относящегося к семейству провоспалительных цитокинов, что его способность ингибировать апоптоз опухолевых и эндотелиальных клеток направлена на поддержание воспалительной реакции в очаге неоплазмы.

Выявленная нами прямая корреляционная связь между соотношением ИВПА на продукцию ИКК крови IL-1ra и IL-1 β (IL-1ra/IL-1 β) и ИВПА на экспрессию VEGF-A аденокарциномой и ее микроокружением, свидетельствует о сопряженности продукции IL-1ra ИКК крови с экспрессией VEGF-A, благодаря чему создаются условия для поддержания неоплазмой воспаления на уровне, необходимом для создания оптимальных условий ее жизнедеятельности, и ингибирования чрезмерно выраженной воспалительной реакции, которая может привести к деструкции опухоли [24]. Не исключено, что этим можно объяснить обратную корреляционную связь между экспрессией VEGF-A и мито-

зами и патмитозами, т.е. за счет рецепторного антагониста IL-1ra обеспечивается необходимый уровень VEGF-зависимой васкуляризации опухоли.

Было показано, что ИВПА на продукцию VEGF-A аденокарциномой находился в прямой корреляционной связи с ИВПА на продукцию IL-2 и IL-10 в супернатанте опухоли. В связи с этим следует отметить, что IL-2 участвует в апоптозе Т-лимфоцитов, в генерации и обеспечении гомеостаза регуляторных Т-клеток, ответственных за толерантность к аутоантигенам, в том числе и к опухолеассоциированным, а также может быть причиной активации апоптоза в антиген-презентирующих цитотоксических лимфоцитов после распознавания ими опухоли как «свое» [16, 27]. Кроме того, выявлена способность IL-2, совместно с IL-12, стимулировать продукцию IL-10 НК-клетками периферической крови и увеличивать продукцию IL-10 Т-регуляторными клетками через активацию фактора транскрипции STAT5 [21, 25]. В свою очередь, IL-10 может супрессировать некоторые функции иммунокомпетентных клеток [19].

Таким образом, в результате проведенного исследования было выявлено несколько пересекающихся, разветвляющихся и даже замыкающихся в «круг» цепей корреляционных связей. Одним из примеров такой замкнутой цепи может служить последовательность выявленных нами корреляционных связей: VEGF-A (иммуногисто-

химический показатель экспрессии по ИВПА) – IL-10 (ИВПА на продукцию в супернатанте опухоли) – IL-8 (ИВПА на продукцию в супернатанте опухоли) – MCP-1 (ИВПА на продукцию в супернатанте опухоли) – IL-6 (ИВПА на продукцию в супернатанте опухоли) – IL-10 (ИВПА на продукцию в супернатанте опухоли) – VEGF-A (иммуногистохимический показатель экспрессии по ИВПА).

Полученные данные свидетельствуют о том, что вероятной «привязкой» цитокинпродуцирующих резервов ИКК крови и опухоли с ее микроокружением является другая по сути «кондиционная» среда, в которой накапливаются опухолеассоциированные антигены [9, 12], обладающие способностью, во-первых, супрессировать функциональную активность М1 субпопуляции макрофагов, а во-вторых – «направлять» поляризацию макрофагов в М2-направлении дифференцировки и их активацию, которые подавляют функциональную активность ИКК [26]. Попадая в такую среду ИКК крови, обладающие более высокой функциональной активностью в циркуляторном русле, снижают ее, что характеризуется более низкими ИВПА на продукцию цитокинов, а более высокий уровень ИВПА на продукцию IL-18 в супернатанте, оказывающий прямой или косвенный проонкогенный эффект, объясняется способностью аденокарциномы и ее микроокружения продуцировать этот цитокин.

Список литературы / References

1. Аверкин М.А., Златник Е.Ю., Шапошников А.В., Никипелова Е.А., Геворкян Ю.А. Изучение локального уровня цитокинов при раке толстой и прямой кишки // Сибирский онкологический журнал, 2011. Приложение № 1. С. 7-8. [Averkin M.A., Zlatnik E.Yu., Shaposhnikov A.V., Nikipelova E.A., Gevorkian Yu.A. The study of the local level of cytokines in cancer of the colon and rectum. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2011, Suppl. no. 1, pp. 7-8. (In Russ.)]
2. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с. [Avtandilov G.G. Medical morphometry]. Moscow: Medicine, 1990. 384 p.
3. Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Генинг С.О. Динамика изменений уровней цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) и их роль в развитии полимодальных локальных и дистантных эффектов при прогрессирующих формах рака яичников // Цитокины и воспаление, 2013. Т. 12, № 4. С. 43-49. [Antoneeva I.I., Abakumova T.V., Gening T.P., Gening S.O. Time course of the cytokine levels (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) and the role of cytokines in the development of polymodal local and distant effects in progressing forms of ovarian cancer. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 4, pp. 43-49. (In Russ.)]
4. Аутеншлюс А.И., Соснина А.В., Михайлова Е.С., Лыков А.П., Морозов Д.В., Великая Н.В., Фурсов С.А., Вараксин Н.А. Провоспалительные цитокины и регуляторы их активности у больных раком желудочно-кишечного тракта // Цитокины и воспаление, 2009. Т. 8, № 4. С. 18-22. [Autenshlyus A.I., Sosnina A.V., Mikhailova E.S., Lykov A.P., Morozov D.V., Velikaya N.V., Fursov S.A., Varaksin N.A. Proinflammatory cytokines and regulators of their activity in patients with gastrointestinal cancer. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2009, Vol. 8, no. 4, pp. 18-22. (In Russ.)]
5. Аутеншлюс А.И., Соснина А.В., Михайлова Е.С., Морозов Д.В., Вараксин Н.А., Рукавишников М.Ю., Козлова Ю.Н., Каньшина А.В. Цитокины и патогистологическая картина злокачественных новообразований при раке желудочно-кишечного тракта // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11. № 1. С. 29-34. [Autenshlyus A.I., Sosnina A.V., Mikhailova E.S., Morozov D.V., Varaksin N.A., Rukavishnikov M.Yu.,

Kozlova Yu.N., Kanshina A.V. Cytokines and histopathologic pattern of malignant neoplasms in gastrointestinal cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 1, pp. 29-34. (In Russ.) <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2009-1-29-34>

6. Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилокинами // Иммунология, 2000. № 5. С. 11-17. [Vasilyeva G.I., Ivanova I.A., Tyukavkina S.Yu. Cooperative interaction of mono- and polynuclear phagocytes mediated by mono- and neutrophilokines. *Immunologiya = Immunology*, 2000, no. 5, pp. 11-17. (In Russ.)]

7. Гранов А.М., Молчанов О.Е. Канцерогенез и иммунобиология опухоли. Функциональные и клинические аспекты // Вопросы онкологии, 2008. Т. 54, № 4. С. 401-409. [Granov A.M., Molchanov O.E. Carcinogenesis and immunobiology of tumor. Fundamental and clinical aspects. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2008, Vol. 54, no. 4, pp. 401-409. (In Russ.)]

8. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление, 2003. Т. 2, № 3. С. 20-35. [Demyanov A.V., Kotov A.Yu., Simbirtsev A.S. Diagnostic value of cytokine studies in clinical practice. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2003, Vol. 2, no. 3, pp. 20-35. (In Russ.)]

9. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г. Регуляторные Т-клетки и их роль в противоопухолевом иммунном ответе // Вопросы онкологии, 2009. Т. 55, № 3. С. 269-277. [Kadagidze Z.G., Chertkov A.I., Slavina E.G. Regulatory T-cells and their role in antitumor immune responses. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2009, Vol. 55, no. 3, pp. 269-277. (In Russ.)]

10. Семинский И.Ж., Серебренникова С.Н., Гузовская Е.В., Семенов Н.В. Роль цитокинов в патогенезе заболеваний // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 131, № 8. С. 30-33. [Seminsky I.Zh., Serebrennikova S.N., Guzovskaya E.V., Semenov N.V. The role of cytokines in the pathogenesis of diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2014, Vol. 131, no. 8, pp. 30-33. (In Russ.)]

11. Сенников С.В., Силков А.Н., Козлов В.А. Аллельные варианты и изоформы цитокинов в диагностике и патогенезе иммунопатологических состояний // Иммунология, 2002. Т. 23, № 4. С. 243-250. [Sennikov S.V., Silkov A.N., Kozlov V.A. Allele variants and isoforms of cytokines in diagnostics and pathogenesis of immunopathological conditions. *Immunologiya = Immunology*, 2002, Vol. 23, no. 4, pp. 243-250. (In Russ.)]

12. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск: ЗАО ИПП «Офсет», 2014. 128 с. [Sosnina A.V., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Grishaev M.P., Autenshlyus A.I. The role of cytokines in the pathogenesis of malignant tumors]. Novosibirsk: ZAO IPP «Offset», 2014. 128 p.

13. Шичкин В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой/антицитокиновой терапии // Иммунология, 1998. № 2. С. 9-13. [Shichkin V.P. Pathogenetic significance of cytokines and prospects cytokine/anticytokine therapy. *Immunologiya = Immunology*, 1998, no. 2, pp. 9-13. (In Russ.)]

14. Якушенко Е.В., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Интерлейкин-18 и его роль в иммунном ответе // Медицинская иммунология, 2005. № 4. С. 355-364. [Yakushenko E.V., Lopatnikova Yu.A., Sennikov S.V. IL-18 and immunity. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 355-364. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2005-4-355-364>

15. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, Vol. 9, pp. 361-371.

16. Bachmann M.F., Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep.*, 2007, Vol. 8, no. 12, pp. 1142-1148.

17. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N. Engl. J. Med.*, 2000, Vol. 343, no. 10, pp. 732-734.

18. Grosicki S., Grosicka A., Holowiecki J. Clinical importance of angiogenesis and angiogenic factors in oncohematology. *Wiad. Lek.*, 2007, Vol. 60, no. 1-2, pp. 39-46.

19. Hao N.B., Lu M., Fan Y., Cao Y., Zhang Z., Yang S. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, no. 948098.

20. Frey A.B., Monu N. Effector-phase tolerance: another mechanism of how cancer escapes antitumor immune response. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, Vol. 79, no. 4, pp. 652-662.

21. Mehrotra P., Donnelly R., Wong S., Kanegane H., Geremew A., Mostowski H., Furuke K., Siegel J., Bloom E. Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, no. 6, pp. 2637-2644.

22. Park S., Cheon S., Cho D. The Dual Effects of Interleukin-18 in Tumor Progression. *Cellular & Molecular Immunology*, 2007, Vol. 4, no. 5, pp. 329-335.

23. Solberg T., Nearman J., Mullins J., Li S., Baranowska-Kortylewicz J. Correlation between tumor growth delay and expression of cancer and host VEGF, VEGFR2, and osteopontin in response to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2008, Vol. 72, no. 3, pp. 918-926.

24. Triozzi P.L., Aldrich W., Singh A. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on tumor stroma in experimental uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, Vol. 52, no. 8, pp. 5529-5535.

25. Tsuji-Takayama K., Suzuki M., Yamamoto M., Harashima A., Okochi A., Otani T., Inoue T., Sugimoto A., Toraya T., Takeuchi M., Yamasaki F., Nakamura S., Kibata M. The production of IL-10 by human regulatory T cells is enhanced by IL-2 through a STAT5-responsive intronic enhancer in the IL-10 locus. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 6, pp. 3897-3905.

26. Williams C., Yeh E., Soloff A. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *Npj Breast Cancer*, 2016, Vol. 2, no. 15025, pp. 1-12.

27. Witkowska A.M. On the role of sIL-2R measurements in rheumatoid arthritis and cancers. *Mediators Inflamm.*, 2005, Vol. 2005, no. 3, pp. 121-130.

Авторы:

Архипов С.А. — д.б.н., заведующий лабораторией иммуногистохимии, биохимии и фармакологии, центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Михайлова Е.С. — старший научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики, Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Новосибирск, Россия

Куниц Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории патологической физиологии иммунной системы, центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Карпухина К.В. — научный сотрудник, Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Новосибирск, Россия

Могильная Е.Д. — стажер-исследователь, центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Соловьев К.А. — стажер-исследователь, центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Вараксин Н.А. — заведующий лабораторией цитокинов, Закрытое акционерное общество «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Аутеншилюс А.И. — д.б.н., профессор, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия; главный научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики, Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Arkhipov S.A., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Immunohistochemistry, Biochemistry and Pharmacology, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Mikhailova E.S., Senior Research Associate, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation.

Kunts T.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Pathological Physiology of Immune System, Central Research Laboratory of Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Karpukhina K.V., Research Associate, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

Mogilnaya E.D., Research Intern, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation.

Solovyev K.A., Research Intern, Central Research Laboratory of Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Varaksin N.A., Head, Cytokine Laboratory, Joint Stock Company "Vector-Best", Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Autenshlyus A.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Main Research Associate, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 03.06.2016
Принята к печати 20.06.2016

Received 03.06.2016
Accepted 20.06.2016