

На правах рукописи



ЧУРОВ
Алексей Викторович

**РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ И
ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА- β ПРИ
ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ**

03.03.01 – физиология
14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петрозаводск
2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук
«Институт биологии Карельского научного центра РАН»

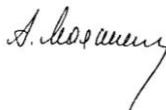
- Научный руководитель:** доктор биологических наук
Евгения Константиновна Олейник
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук
Вадим Александрович Иванов
- доктор медицинских наук
Екатерина Прохоровна Киселёва
- Ведущая организация:** Кафедра физиологии человека и
животных ГОУВПО «Петрозаводский
государственный университет»

Защита диссертации состоится «___» декабря 2010 года в ___ часов на заседании объединенного диссертационного совета (ДМ 212.087.02) при ГОУВПО «Карельская государственная педагогическая академия» по адресу: 185680, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельской государственной педагогической академии.

Автореферат разослан: « ____ » ноября 2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент



А.И. Малкиель

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Несмотря на интенсивное изучение состояния иммунитета при опухолевом росте, основные закономерности формирования иммунных нарушений в онкогенезе по-прежнему не определены. В настоящее время не сформированы четкие представления о значении иммунной системы в процессе возникновения и развития опухолей.

В современных исследованиях, посвященных нарушениям иммунофизиологических функций при опухолевом росте, большое внимание уделяется изучению механизмов регуляции иммунного ответа и сохранения постоянства внутренней среды организма. Важную роль в поддержании гомеостаза в иммунной системе играют регуляторные Т-клетки (Treg), основными маркерами которых являются мембранные антигены CD4, CD25 и внутриклеточный транскрипционный фактор FOXP3 (forkhead box P3). В последние годы были получены данные, свидетельствующие об увеличении численности Treg-клеток у больных с опухолями (Hueman et al., 2006; Leong et al., 2006; Miller et al., 2006; Ling et al., 2007). Оказалось, что повышенное содержание Treg-лимфоцитов ассоциировано с неблагоприятным прогнозом при опухолевом росте (Curiel et al., 2004; Petersen et al., 2006; Yakirevich, Resnick, 2007). Эти данные позволяют предполагать, что Treg-клетки имеют решающее значение в патогенезе онкологических заболеваний.

По мнению ряда авторов (Nomura, Sakaguchi, 2005; Beyer, Schultze, 2006; Knutson et al., 2007) в ходе онкогенеза Treg-лимфоциты обеспечивают формирование иммунологической толерантности к антигенам опухоли благодаря супрессии функциональной активности эффекторов противоопухолевого иммунного ответа: натуральных киллеров, цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), Т-хелперов и антигенпрезентирующих клеток. Однако механизмы, индуцирующие дифференцировку и активацию Treg-клеток, а также обеспечивающие их функционирование, не изучены.

Предполагается, что одним из медиаторов функциональной активности Treg-клеток является трансформирующий фактор роста- β (TGF- β) (Zhang et al., 2006; Wan, Flavell, 2007). Важным свойством TGF- β является плеiotропность, что в значительной степени обуславливает широкий спектр его биологического действия и иммунорегуляторную активность. Известно, что TGF- β регулирует функции всех видов иммунокомпетентных клеток. Наиболее сильное действие и, главным образом, иммуносупрессорное, TGF- β оказывает на Т-клетки: подавляет пролиферацию, блокирует секрецию IL-2, ингибирует дифференцировку

T-хелперов первого и второго типа (Li, 2006; Zhang et al., 2006) и может стимулировать образование Treg-клеток (Rao et al., 2005; Liu et al., 2007).

Особенности функционирования TGF- β и Treg-клеток представляют большой интерес при изучении состояния иммунитета в условиях опухолевого роста. Активация, увеличение численности Treg-лимфоцитов и ингибирующее действие TGF- β могут быть ключевыми механизмами возникновения иммунных нарушений в онкогенезе, которые приводят к супрессии противоопухолевого иммунного ответа и формированию толерантности к опухолевым антигенам. Изучение функциональной взаимосвязи Treg-клеток и TGF- β открывает перспективы для разработки новых методов оценки степени иммунной супрессии и эффективной иммунотерапии у больных с опухолями.

Цель исследования состояла в изучении роли Treg-клеток и TGF- β в формировании иммунной супрессии при опухолевом росте.

Задачи исследования:

1. Изучить численность различных популяций лимфоцитов периферической крови (T-клеток, T-хелперов, ЦТЛ, наивных CD4⁺ T-лимфоцитов, CD4⁺ T-клеток памяти, B-лимфоцитов) при опухолевом росте.
2. Определить содержание Treg-клеток периферической крови в норме и при опухолевом росте.
3. Изучить уровень экспрессии генов цитокина TGF- β (TGF- β 1) и транскрипционного фактора FOXP3 в лимфоцитах периферической крови в процессе онкогенеза.
4. Исследовать особенности экспрессии основных компонентов сигнального пути TGF- β (TGF- β 1, TGF- β RII, FOXP3, Smad3 и Smad7) в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте.
5. Провести сравнительное изучение функционального состояния популяции Treg-клеток по уровню экспрессии TGF- β (TGF- β 1) и транскрипционного фактора FOXP3 в лимфоцитах периферической крови у лиц с опухолями, аутоиммунной патологией и хронической вирусной инфекцией.

Научная новизна работы. Работа содержит новые данные о роли TGF- β и Treg-клеток в развитии иммунной супрессии при опухолевом росте. Впервые на клеточном и молекулярном уровне дана комплексная оценка степени иммунной супрессии у онкологических больных. Впервые в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте изучен уровень экспрессии генов, ассоциированных с активностью Treg-клеток и их основного цитокина – TGF- β (TGF- β 1, TGF- β RII, FOXP3, Smad3 и Smad7). Установлено, что в ходе онкогенеза происходит

увеличение экспрессии генов TGF- β 1 и FOXP3 и снижается уровень экспрессии основного ингибитора сигнального пути TGF- β – Smad7, что может рассматриваться как один из механизмов активации супрессорной активности. Впервые дана сравнительная оценка уровня экспрессии генов TGF- β 1 и FOXP3 при различных иммунных патологиях.

Теоретическое и практическое значение работы. На основании результатов проведенного исследования можно предполагать, что в ходе онкогенеза происходит гиперактивация механизмов, вызывающих снижение эффективности противоопухолевого иммунитета. По всей видимости, при опухолевом росте изменяется функционирование эффекторов иммунного ответа в результате снижения их активации, ингибирования пролиферации и развития анергии. В дальнейшем развивается толерантность к антигенам опухоли. Одним из механизмов, обуславливающих эти процессы, является усиление активности Treg-клеток и изменение секреции их функционального медиатора – TGF- β 1.

Полученные результаты дополняют и уточняют имеющиеся в литературе данные о роли Treg-клеток и TGF- β в развитии иммунной супрессии в ходе онкогенеза. Результаты работы целесообразно использовать при разработке методов оценки степени иммунной супрессии у онкологических больных. Материалы диссертации могут применяться при чтении курсов лекций по общей, молекулярной и клинической иммунологии для студентов ВУЗов.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. При опухолевом росте в периферической крови увеличивается численность Treg-клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺.
2. В ходе онкогенеза происходит усиление экспрессии генов TGF- β 1 и FOXP3, ассоциированных с активностью Treg-клеток. При этом их экспрессия увеличивается по мере развития опухолевого процесса.
3. Одним из механизмов активации сигнального пути TGF- β в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте является увеличение экспрессии изоформы TGF- β 1 и снижение экспрессии медиатора Smad7.

Конкурсная поддержка работы. Работа выполнена в рамках Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (2008 г.) и при финансовой поддержке РФФИ (грант № 08-04-98838).

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на XI, XII и XIII Всероссийских научных форумах с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург 2007, 2008, 2009), IV съезде иммунологов России (Санкт-Петербург, 2008), VI Молодежной научной конференции «Физиология человека и животных:

от эксперимента к клинической практике» (Сыктывкар, 2007) и XVI Международной научной конференции «Ломоносов» (Москва, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, из них 8 статей, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста, содержит 13 таблиц, 25 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, а также списка литературы, включающего 211 источников, из них 207 иностранных.

Благодарности. Выражаю глубокую признательность моему научному руководителю д.б.н. Е.К. Олейник и д.б.н. В.М. Олейник за ценные советы и рекомендации при подготовке диссертации, а также д.м.н. И.Е. Бахлаеву, к.м.н. М.И. Шibaеву, к.м.н. П.И. Ковчуру и к.м.н. А.А. Мясникову за помощь в организации взятия биологического материала.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал исследования

Всего в ходе работы исследовано 160 образцов периферической крови больных (n=121) и здоровых лиц (n=39) из различных районов Республики Карелия. Проведен анализ образцов периферической крови больных колоректальным раком (КРР), раком лёгкого (РЛ), желудка (РЖ), молочной железы (РМЖ) в возрасте от 29 до 74 лет. Также были обследованы пробы крови пациентов – носителей хронической папилломавирусной инфекции в возрасте от 19 до 45 лет и больных ревматоидным артритом в возрасте от 21 года до 56 лет. Возраст здоровых лиц варьировал в пределах от 31 года до 68 лет.

Методы исследования

Для *иммунофенотипирования лимфоцитов* цельной крови методом *проточной цитометрии* использовали моноклональные антитела CD4-FITC, CD3-ECD, CD8-PC5, CD19-PE, CD45RO-FITC, CD45RA-ECD, CD25-PC5, CD4-PC7 («Beckman Coulter», США) и соответствующие изотипические контроли. Лизис эритроцитов и фиксацию лимфоцитов в пробе проводили на автоматической станции пробоподготовки TQ-Prep с использованием системы реагентов Immunoprep. Сбор данных производили на проточном цитометре FC500 с применением программного обеспечения CXP 2.0 («Beckman Coulter», США).

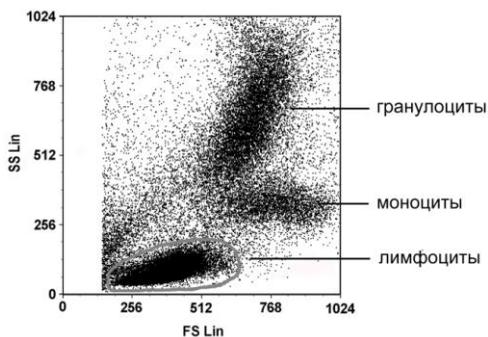


Рис. 1. Распределение субпопуляций лейкоцитов периферической крови по каналам прямого (FS Lin) и бокового (SS Lin) светорассеяния.

Примечание: для удаления из зоны анализа частиц, не соответствующих клеткам по параметрам прямого светорассеяния (дебрис) был использован дискриминатор.

При анализе данных проводили построение гейта лимфоцитов на основании характеристик прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния, исключая моноциты, гранулоциты и дебрис (Рис.1). Подсчет клеток осуществляли до накопления 3×10^4 событий внутри лимфоцитарного гейта.

Выделение тотальной РНК лимфоцитов проводили из 100 мкл цельной крови с использованием набора реагентов «YellowSolve» (АОЗТ «Клоноген», Санкт-Петербург) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Очистку тотальной РНК от примесей геномной ДНК осуществляли с помощью ДНазы (ООО «Силекс», Москва). Чистоту препарата РНК оценивали на спектрофотометре «SmartSpec Plus» («Bio-Rad», США). Нативность РНК определяли методом электрофореза в агарозном геле.

Синтез комплементарной ДНК проводили из 1 мкг тотальной РНК с использованием случайных гексапраймеров и MMLV-обратной транскриптазы (ООО «Силекс», Москва) в амплификаторе «Герцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Москва). Синтезированную комплементарную ДНК хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Праймеры к нуклеотидным последовательностям исследуемых генов (TGF- β 1, TGF- β RII, FOXP3, Smad3 и Smad7) и референсного гена GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) для проведения *полимеразной цепной реакции в реальном времени* подбирали с использованием программы Beacon Designer 5.01 («Premier Biosoft», США). Амплификацию кДНК, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени проводили с использованием реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I (НПК «Синтол», Москва) на приборе «iCycler Thermal Cycler» («Bio-Rad», США) с программным обеспечением «iQ5 Optical System Software» версия 2.0 («Bio-Rad», США). Все реакции проводили в триплетах. Уровень

экспрессии исследуемых генов определяли относительно количества мРНК гена GAPDH методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Культивирование лимфоцитов периферической крови в присутствии рекомбинантного TGF- β 1. Для культивирования лимфоциты периферической крови выделяли на градиенте фиколла плотностью 1,077 г/см³ (ООО НПП «Панэко», Москва). После выделения лимфоцитов концентрацию клеток рассчитывали в камере Горяева. Количество живых клеток, определенное по окрашиванию трипановым синим («Sigma», США) составляло от 97 до 99%. Для стимуляции лимфоцитов использовали анти-CD3-антитела («Медбиоспектр», Москва) в конечной концентрации 2 мкг/мл. Лимфоциты культивировали в 96-луночных планшетах («Corning-Costar», США), в питательной среде RPMI-1640 (ООО НПП «Панэко», Москва), содержащей 25 мМ HEPES, 25 мМ бикарбоната натрия, с добавлением 2мМ/мл L-глутамина («Sigma», США), 100 мкг/мл гентамицина («Gibco», США) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («PAA Laboratories», Австрия). После добавления питательной среды, в каждую лунку вносили суспензию, содержащую 10⁵ клеток и IL-2 («ProSpec», США) в конечной концентрации 10 нг/мл. После всех процедур в лунки вносили рекомбинантный TGF- β 1 («ProSpec», США) в конечных концентрациях 1, 2, 5, 10 и 20 нг/мл. Общий объем культивируемой смеси составлял 200 мкл. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе («ShelLab», США) при температуре 37°C, влажности 95% и 5% содержании CO₂ в течение 24 часов. По окончании культивирования клетки отмывали, определяли их концентрацию в камере Горяева и проводили анализ на цитометре.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Biostat 2007. Достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна-Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. В таблицах и на графиках представлены средние значения с учетом стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

Основные результаты исследования и их обсуждение

1. Содержание основных популяций лимфоцитов в периферической крови при опухолевом росте.

При оценке состояния иммунной системы важными показателями являются содержание Т-клеток, Т-хелперов, ЦТЛ, В-клеток в периферической крови. Результаты работы свидетельствуют о том, что у онкологических больных (n=14) численность основных популяций лимфоцитов была на уровне контроля. Другой важный показатель состояния иммунитета – иммунорегуляторный индекс (ИРИ),

отражающий соотношение Т-хелперов и ЦТЛ, также не отличался от контроля. В то же время можно отметить, что при опухолевом росте количество Т-хелперов и В-клеток было почти на 20% ниже, чем у здоровых лиц, хотя эти различия и не были статистически достоверными (табл. 1).

Таблица 1

Содержание основных популяций лимфоцитов в периферической крови при опухолевом росте (%).

Показатель	Контроль (n=13)	Онкобольные (n=14)	КРР (n=5)	РЛ (n=3)	РМЖ (n=3)	РЖ (n=3)
Т-клетки	69,7±2,2	64,4±3,4	64,0±7,5	68,6±2,2	68,9±2,9	56,4±10,1
Т-хелперы	40,6±2,4	33,6±3,6	26,7±5,7	36,7±9,3	37,9±6,2	37,7±10,2
ЦТЛ	26,8±2,4	28,8±3,6	32,2±6,7	30,7±11,2	31,0±7,4	19,1±1,8
В-клетки	12,8±1,2	10,1±0,9	8,3±1,1*	12,0±2,9	10,9±0,6	10,5±2,8
ИРИ	1,8±0,3	1,6±0,4	1,0±0,3	2,4±1,7	1,4±0,5	2,0±0,6

Исследование численности популяций в зависимости от локализации опухоли выявило пониженное содержание В-клеток при КРР. При других локализациях изученные показатели оказались в пределах нормы (табл.1). Однако при опухолевом росте наблюдались значительные индивидуальные колебания численности некоторых видов лимфоцитов. Так, например, при КРР, РЛ и РЖ в ряде случаев было отмечено низкое количество Т-хелперов, а при РМЖ, РЛ и КРР у некоторых лиц выявлено повышенное содержание ЦТЛ (Рис. 2).

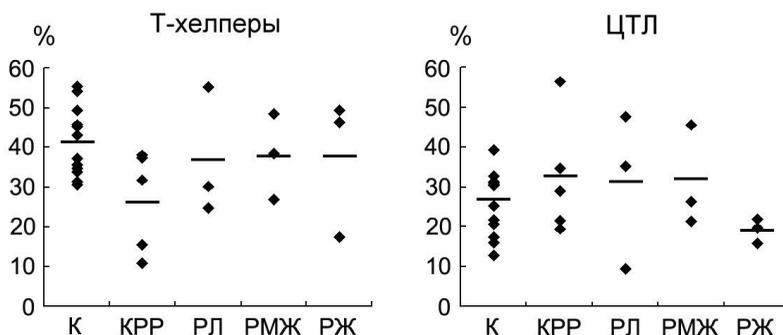


Рис.2. Индивидуальные показатели содержания Т-хелперов и ЦТЛ при опухолевом росте (%), К – контроль. Примечание: горизонтальными линиями показаны средние значения.

2. Содержание наивных клеток, активированных лимфоцитов и клеток памяти внутри популяции CD4-клеток при опухолевом росте.

Соотношение наивных Т-клеток, активированных лимфоцитов и Т-клеток памяти является одним из главных показателей нормального функционирования иммунной системы. CD4⁺ Т-лимфоциты человека можно разделить на наивные клетки, клетки памяти и активированные лимфоциты в зависимости от экспрессии двух изоформ молекулы CD45: CD45RA и CD45RO (Хайдуков, Зурочка, 2008). Пример такого распределения показан на рисунке 3.

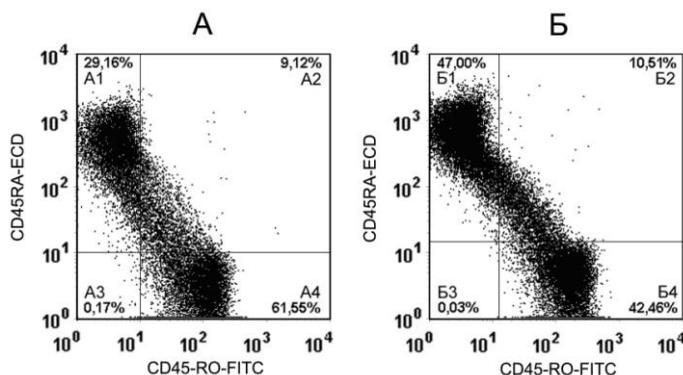


Рис. 3. Пример анализа лимфоцитов периферической крови здорового донора (А) и больного колоректальным раком (Б) методом проточной цитометрии в зависимости от экспрессии маркеров CD45RA и CD45RO. Квадранты А1 и Б1 – наивные Т-клетки, квадранты А2 и Б2 – активированные клетки, квадранты А4 и Б4 – Т-клетки памяти. Примечание: анализ клеток проводился при помощи гейтирования по CD4-клеткам.

По нашим данным, количество наивных лимфоцитов у онкологических больных (n=14) не отличалось от контроля (31,7±2,7% и 30,5±1,0% соответственно). В то же время, число активированных клеток при опухолевом росте было почти вдвое выше, чем в контроле (15,8±1,7% против 8,1±0,5%; p<0,05). В норме активированные клетки составляют менее 10% от общего числа CD4⁺ лимфоцитов (Хайдуков, Зурочка, 2008).

Содержание клеток памяти у больных с опухолями (52,5±2,6%) оказалось ниже (p<0,05), чем в контроле (61,3±0,9%), что может быть связано с нарушением процессов формирования иммунологической памяти при опухолевом росте.

При исследовании содержания наивных Т-лимфоцитов, Т-клеток памяти и активированных Т-клеток у лиц с различной локализацией опухоли был выявлен ряд различий по сравнению со здоровыми лицами (табл. 2). Количество наивных CD4⁺ Т-клеток было выше при РЛ и РМЖ (р<0,05). Низкое относительное содержание Т-лимфоцитов памяти отмечено при КРР, РЛ и РМЖ. У больных КРР и РМЖ также отмечено более высокое содержание активированных клеток. Таким образом, наиболее значительные изменения в содержании наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов и CD4⁺ Т-клеток памяти были выявлены у больных РЛ (табл.2).

Таблица 2

Содержание наивных клеток, клеток памяти и активированных лимфоцитов в периферической крови больных с различной локализацией опухоли (% от числа CD4⁺-клеток).

Показатель	Контроль (n=10)	КРР (n=5)	РЛ (n=3)	РМЖ (n=3)	РЖ (n=3)
Наивные Т-клетки	30,5±1,0	29,1±6,1	39,3±1,2*	35,2±0,7*	25,1±5,4
Т-клетки памяти	61,3±0,9	54,0±3,6*	45,9±4,6*	50,0±2,1*	59,2±9,1
Активированные клетки	8,1±0,5	16,9±3,2*	14,7±5,8	14,7±2,1*	15,8±3,8

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем (р<0,05).

3. CD4⁺CD25⁺ клетки периферической крови при опухолевом росте.

Трег-клетки относятся к популяции CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов. Однако популяция CD4⁺CD25⁺ клеток является гетерогенной по уровню экспрессии мембранной молекулы CD25 и состоит из клеток с низкой (CD4⁺CD25^{dim}) и высокой (CD4⁺CD25^{high}) экспрессией этого антигена. Лимфоциты с фенотипом CD4⁺CD25^{high} принято относить к Трег-клеткам, так как они проявляют супрессорную активность. В периферической крови CD4⁺CD25^{high} клетки составляют по разным данным 1-3% от общего числа лимфоцитов или около 5% среди CD4-клеток (Sasaki et al., 2004; Knutson et al., 2007). Пример анализа популяции CD4⁺CD25^{high} лимфоцитов показан на рисунке 4.

Содержание Трег-клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high} в контроле было равным 2,4±0,1% от общего числа лимфоцитов, что с учётом среднего возраста обследованных нами лиц (52,1±2,2 года) согласуется с литературными данными (Gregg et al., 2005). У онкологических больных количество CD4⁺CD25^{high} клеток среди лимфоцитов было выше, чем в контроле (табл. 3).

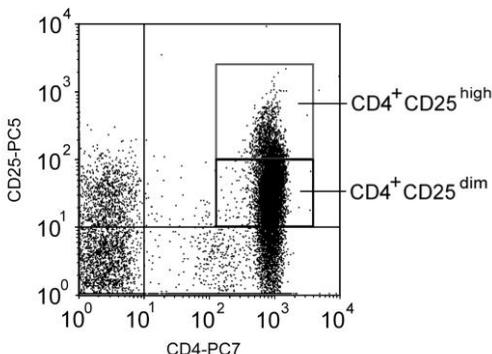


Рис.4. Пример анализа популяции $CD4^+CD25^{high}$ клеток методом проточной цитометрии. Примечание: анализ клеток проводился при помощи гейтирования по лимфоцитам.

При исследовании содержания Treg-клеток в зависимости от локализации опухоли были выявлены некоторые особенности. Так, при РЛ и РМЖ содержание $CD4^+CD25^{high}$ клеток заметно отличалось от контроля, тогда как при КРР и РЖ различий выявлено не было.

Более значительные изменения отмечены при исследовании содержания $CD4^+CD25^{high}$ клеток внутри популяции $CD4^+$ -лимфоцитов (табл. 3). Содержание Treg в контроле составило $5,0 \pm 0,3\%$, тогда как при опухолевом росте – $7,2 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$). Было отмечено увеличение количества Treg внутри популяции $CD4^+$ клеток при РЛ, РМЖ, КРР. В то же время при раке желудка число $CD4^+CD25^{high}$ клеток не отличалось от контроля.

Особый интерес представляло исследование содержания $CD4^+CD25^{high}$ клеток внутри популяции $CD4^+$ лимфоцитов имеющих маркер CD45RO, поскольку в литературе имеются данные о том, что Treg-клетки отличаются высокой экспрессией этого антигена (Yi et al., 2006).

Таблица 3

Содержание Treg-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}$ в периферической крови больных с опухолями (%).

Группы	$CD4^+CD25^{high}$ / Лимфоциты	$CD4^+CD25^{high}$ / $CD4^+$ -клетки	$CD4^+CD25^{high}$ / $CD4^+CD45RO^+$
Контроль (n=10)	$2,4 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,3$	$6,4 \pm 0,3$
Онкологические больные (n=14)	$3,2 \pm 0,3^*$	$7,2 \pm 0,5^*$	$10,2 \pm 1,0^*$
РЛ (n=3)	$3,6 \pm 0,2^*$	$7,6 \pm 0,7^*$	$12,9 \pm 2,8^*$
РМЖ (n=3)	$3,2 \pm 0,1^*$	$6,7 \pm 0,8^*$	$9,0 \pm 1,5$
КРР (n=5)	$3,3 \pm 0,9$	$7,6 \pm 1,1^*$	$10,4 \pm 1,8^*$
РЖ (n=3)	$2,8 \pm 0,4$	$6,5 \pm 1,4$	$8,2 \pm 1,9$

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

При изучении содержания $CD4^+CD25^{high}$ клеток с учетом экспрессии маркеров $CD4^+$ и $CD45RO^+$ был выявлен ряд существенных различий относительно контроля. Так, количество $CD45RO^+$ Трег-клеток у онкологических больных было выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Значительное изменение численности Трег-клеток было отмечено при РЛ и КРР, тогда как при РМЖ и РЖ различий выявлено не было.

Таким образом, установлено, что количество Трег-клеток увеличивается при опухолевом росте. Наиболее значительные изменения численности Трег-клеток выявлены при КРР и РЛ. По всей видимости, Трег-лимфоциты могут служить удобным индикатором степени иммунной супрессии у больных с опухолями. При этом для определения клеток-супрессоров большое значение имеет набор используемых маркеров. По нашим данным, применение маркера клеток памяти – $CD45RO^+$ может успешно применяться при идентификации Трег-лимфоцитов.

4. Исследование экспрессии маркеров Трег-клеток (TGF- β 1 и FOXP3) в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте.

Для оценки состояния популяции Трег-клеток у онкологических больных было проведено исследование экспрессии генов TGF- β 1 и FOXP3, ассоциированных с активностью клеток-супрессоров (Ярилин, Донецкова, 2006; Chen, Wahl, 2003; Yagi et al., 2004).

Проведенное исследование показало, что уровень относительной экспрессии TGF- β 1 при опухолевом росте оказался значительно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (Рис. 5).

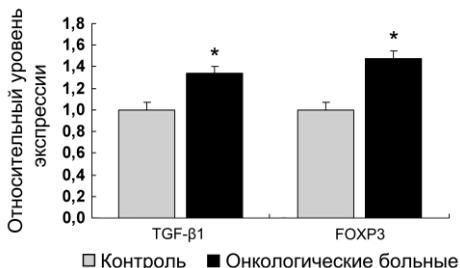


Рис.5. Экспрессия генов TGF- β 1 и FOXP3 в лимфоцитах периферической крови больных с опухолями (n=33) и здоровых доноров (n=15).

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

При изучении содержания мРНК транскрипционного фактора FOXP3 в лимфоцитах периферической крови онкологических больных установлено, что уровень экспрессии гена FOXP3 у больных с опухолями оказался заметно выше, чем в контрольной группе (Рис. 5).

Уровень экспрессии генов TGF- β 1 и FOXP3 определяли также на разных стадиях опухолевого процесса (Рис. 6).

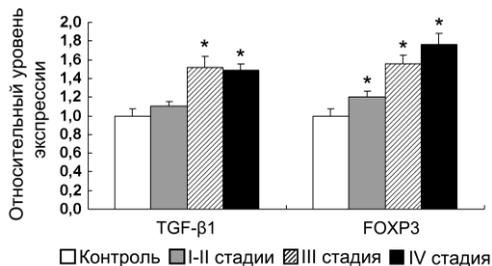


Рис.6. Экспрессия генов TGF- β 1 и FOXP3 в лимфоцитах периферической крови на разных стадиях опухолевого роста.

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Самые незначительные изменения экспрессии генов TGF- β 1 и FOXP3 отмечены на I и II стадиях заболевания. Уровень экспрессии цитокина TGF- β 1 в группе больных с I-II стадиями не отличался от контроля. Величина экспрессии другого маркера Трег-клеток – FOXP3, также была самой низкой у лиц с опухолями на I-II стадиях, но при этом оказалась выше, чем в контроле ($p < 0,05$). На поздних стадиях выявлены более существенные различия. Содержание мРНК TGF- β 1 на III и IV стадиях онкогенеза было в полтора раза выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Уровень экспрессии FOXP3 на поздних стадиях опухолевого роста также оказался более высоким. В группе больных с опухолями на III стадии уровень экспрессии FOXP3 составил $1,56 \pm 0,09$, а у больных с IV стадией – $1,76 \pm 0,12$, что значительно выше, чем в контроле ($p < 0,05$).

Для изучения содержания мРНК генов TGF- β 1 и FOXP3 в зависимости от локализации опухоли были исследованы пробы крови больных КРР и РЛ (Рис. 7). Оказалось, что количество мРНК TGF- β 1 в лимфоцитах периферической крови больных КРР и РЛ значительно выше, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При РЛ отмечен более высокий уровень экспрессии TGF- β 1, в отличие от больных КРР.

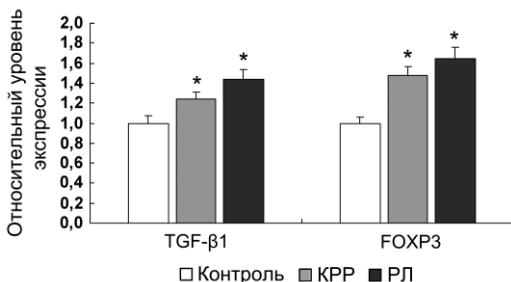


Рис.7. Экспрессия генов TGF- β 1 и FOXP3 в лимфоцитах периферической крови. КРР – колоректальный рак ($n=22$), РЛ – рак лёгкого ($n=11$).

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Величина экспрессии транскрипционного фактора FOXP3 в лимфоцитах периферической крови больных КРР и РЛ также была выше, чем в контроле ($p < 0,05$). Следует отметить, что уровень экспрессии FOXP3 в лимфоцитах крови у больных РЛ оказался значительно выше, чем при КРР ($p < 0,05$).

Таким образом, исследование показало, что при опухолевом росте происходит увеличение экспрессии ингибирующего цитокина – TGF- β 1, а также внутриклеточного маркера FOXP3. Отмечается тенденция к увеличению экспрессии этих генов по мере развития опухолевого процесса, что указывает на усиление активации Treg-клеток. При КРР изменения экспрессии генов TGF- β 1 и FOXP3 были менее значительными, тогда как при РЛ содержание мРНК TGF- β 1 и FOXP3 было выше. Результаты настоящего исследования позволяют предполагать, что в процессе формирования иммунной супрессии при опухолевом росте происходит изменение функциональной активности Treg-клеток, что сопровождается усилением экспрессии генов FOXP3 и TGF- β 1.

5. Изучение экспрессии основных компонентов сигнального пути TGF- β в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте.

По некоторым данным, TGF- β может стимулировать дифференцировку Treg-лимфоцитов (Perrot et al., 2007), а также ингибировать функции эффекторов противоопухолевого иммунного ответа: Т-хелперов, ЦТЛ, дендритных клеток (Chen et al., 2005; Larmonier et al., 2007). В связи с этим, значительный интерес представляет изучение роли TGF- β в механизмах супрессии с участием Treg-клеток и в процессе их дифференцировки на периферии. Однако молекулярные механизмы этих воздействий требуют дальнейшего, всестороннего изучения. Поэтому было проведено исследование экспрессии основных компонентов сигнального пути TGF- β : TGF- β 1, TGF- β RII, FOXP3, Smad3 и Smad7.

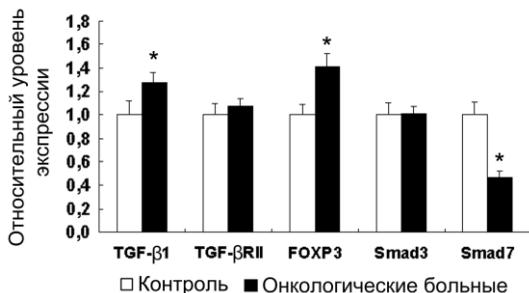


Рис. 8. Экспрессия генов сигнального пути TGF- β в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте. Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Уровень экспрессии генов TGF- β 1 и FOXP3 в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте был выше, чем в контроле, тогда как уровень экспрессии TGF- β RII значительно не изменялся (Рис.8). Особый интерес представляло исследование изменения экспрессии молекул семейства Smad, которые выполняют ключевую роль в активации (Smad3) и подавлении (Smad7) передачи сигнала при связывании TGF- β 1 с рецептором. Проведенное исследование показало, что в лимфоцитах периферической крови не изменяется экспрессия активатора сигнального пути TGF- β 1 – Smad3. Согласно данным литературы, транскрипционный фактор Smad3 необходим при передаче сигнала и подавлении функций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток под действием TGF- β 1 (McKarns, Schwartz, 2005). Таким образом, можно предположить, что при опухолевом росте механизм активации сигнального пути TGF- β 1 на уровне Smad3 функционирует без изменений. В то же время, уровень экспрессии ингибирующего медиатора Smad7 в лимфоцитах периферической крови оказался значительно ниже, чем в контроле ($p < 0,05$). Аналогичные данные были получены и другими исследователями. Например, в работе Fantini и соавт. (Fantini et al., 2004) было показано, что TGF- β 1 может стимулировать развитие регуляторного фенотипа у CD4⁺CD25⁻ клеток путём индукции мРНК FOXP3 и подавления экспрессии Smad7.

Таким образом, усиление супрессорной активности при опухолевом росте, вероятно, происходит в результате увеличения экспрессии TGF- β 1 и снижения экспрессии медиатора Smad7.

6. Сравнительное исследование экспрессии молекулярных маркеров Treg (FOXP3 и TGF- β 1) при вирусных инфекциях, аутоиммунных и онкологических заболеваниях.

В последнее время большое внимание уделяется изучению механизмов регуляции иммунного ответа при различных заболеваниях. По современным представлениям основными эффекторами иммунитета, обеспечивающими выполнение регуляторных функций, являются Treg-лимфоциты. Treg-клетки обеспечивают не только нормальное протекание физиологических процессов, но в то же время контролируют развитие патологий (Chatila, 2005; Belkaid et al., 2006; Strauss et al., 2007a). В частности, при различных аутоиммунных заболеваниях наблюдается уменьшение численности Treg-клеток (Crispin et al., 2003; Longhi et al., 2004) и снижение их супрессорной активности (Viglietta et al., 2004; Longhi et al., 2005; Kekäläinen et al., 2007). Было показано, что Treg-лимфоциты участвуют в регуляции вирусспецифического иммунитета (Воробьев и др., 2006; Ярилин, Донецкова, 2006). В последнее время

изменение функциональной активности Трег-клеток рассматривается в качестве одного из основных механизмов иммунной супрессии при опухолевом росте (Knutson, 2007; Yakirevich, Resnick, 2007).

Целью данного исследования было сравнительное изучение состояния иммунной супрессии при онкологических, аутоиммунных заболеваниях, а также у больных с хронической вирусной инфекцией (вирус папилломы человека). Оценка степени иммунной супрессии проводилась по уровню экспрессии TGF- β 1 и FOXP3.

У лиц с аутоиммунной патологией не выявлено изменений в экспрессии мРНК TGF- β 1 относительно контроля. В то же время, уровень относительной экспрессии TGF- β 1 при опухолевом росте и у лиц с вирусной инфекцией оказался значительно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (Рис. 9).

При опухолевом росте уровень экспрессии гена FOXP3 оказался заметно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$) (Рис. 9).

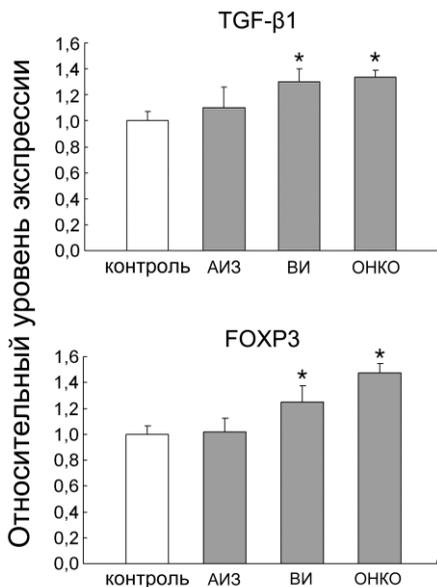


Рис. 9. Уровень экспрессии TGF- β 1 и FOXP3 в лимфоцитах периферической крови. Условные обозначения: АИЗ – аутоиммунные заболевания; ВИ – хроническая вирусная инфекция; ОНКО – опухоли различной локализации. Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

У лиц с хронической вирусной инфекцией относительное количество мРНК гена FOXP3 было несколько ниже, чем у больных с опухолями, но отличалось от контроля ($p < 0,05$). В случае с аутоиммунной патологией различий в уровне экспрессии гена FOXP3 выявлено не было.

Изучение экспрессии генов, ассоциированных с активностью Трег-клеток в лимфоцитах периферической крови больных при различных патологиях показало, что наиболее высокое содержание мРНК TGF- β 1 и FOXP3 отмечается в лимфоцитах периферической крови онкологических больных и у лиц с хронической вирусной инфекцией. Результаты исследования согласуются с данными литературы

(Воробьев и др., 2006; Насонов, Быковская, 2006; Chatila, 2005; Franzke et al., 2006) о роли Трег-клеток при опухолевом росте, аутоиммунных процессах, хронических вирусных инфекциях и свидетельствуют о возможности применения маркеров TGF- β 1 и FOXP3 для оценки состояния популяции Трег-клеток.

7. Изучение влияния рекомбинантного TGF- β 1 на CD4⁺CD25⁺ клетки в культуре лимфоцитов периферической крови.

Многочисленные исследования свидетельствуют о значительной роли TGF- β в регуляции иммунных реакций организма при опухолевом росте. Однако, изучение функций TGF- β осложняется тем, что его активность может изменяться под действием факторов микросреды и, главным образом, это происходит при участии различных про- и противовоспалительных цитокинов. Поэтому, для изучения свойств цитокина было проведено исследование его воздействия на клетки-мишени в условиях *in vitro*.

Целью эксперимента было изучение воздействия рекомбинантного человеческого TGF- β 1 на CD4⁺CD25⁺ клетки при культивировании лимфоцитов периферической крови в зависимости от его концентрации, а также наличия экзогенного IL-2.

Результаты эксперимента представлены на рисунке 11. Оказалось, что с увеличением концентрации рекомбинантный TGF- β 1 оказывает ингибирующее действие на CD4⁺CD25⁺ клетки при культивировании, что отражается в изменении относительного содержания CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов, а также снижении интенсивности флюоресценции по CD25.

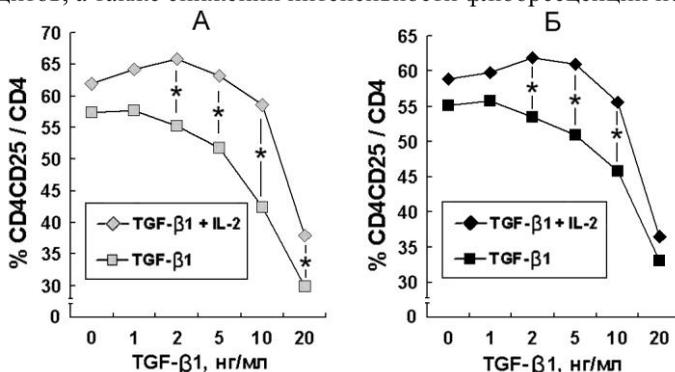


Рис.11. Изменение содержания CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов (% от числа CD4⁺-клеток) в зависимости от концентрации рекомбинантного TGF- β 1. А – контроль (n=6), Б – онкологические больные (n=10). Примечание: * – различия достоверны между группами («TGF- β 1» и «TGF- β 1+IL-2») (p<0,05).

Характер воздействия TGF- β 1 на клетки изменялся при добавлении в культуру экзогенного IL-2. При этом исходный уровень содержания CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов, соответствующий концентрации TGF- β 1 равной 0 нг/мл, был несколько выше (Рис. 11). С увеличением концентрации TGF- β 1 от 0 нг/мл до 2 нг/мл при культивировании лимфоцитов в присутствии равных доз IL-2, относительное количество CD4⁺CD25⁺ клеток возрастало, что можно объяснить кооперативным действием цитокинов по усилению экспрессии молекул CD25. Таким образом, наиболее высокое содержание CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов, как в опытных образцах, так и в контроле достигалось при концентрации TGF- β 1 равной 2 нг/мл (Рис. 11). В дальнейшем, с увеличением концентрации TGF- β 1 до 5 нг/мл, наблюдалось незначительное снижение количества лимфоцитов, несущих маркер CD25. Однако численность CD4⁺CD25⁺ клеток при этом оставалась на высоком уровне. Начиная с концентрации 10 нг/мл, отмечалась ингибирующее действие TGF- β 1 на клетки, а воздействие цитокина в концентрации 20 нг/мл почти полностью нивелировало эффект от присутствия IL-2.

Таким образом, исходя из результатов эксперимента, можно заключить, что TGF- β 1 оказывает ингибирующее действие на лимфоциты при культивировании, в результате чего с ростом концентрации супрессорного цитокина происходит снижение экспрессии молекул CD25. Однако, наличие в культуре лимфоцитов дополнительно экзогенного IL-2 оказывает положительный кооперативный эффект на CD4⁺CD25⁺ лимфоциты, что способствует возрастанию их количества при низких концентрациях TGF- β 1 (1-5 нг/мл). Важно отметить, что увеличение численности CD25⁺-клеток, может быть связано как с изменениями фенотипа клеток при их активации, так и в результате роста числа регуляторных лимфоцитов в процессе культивирования. По некоторым данным, IL-2 и TGF- β при совместном воздействии могут способствовать индукции фенотипа Treg-клеток, усиливать экспрессию FOXP3, а также мембранного маркера CD25 (Davidson et al., 2007; Zheng et al., 2007).

ВЫВОДЫ

1. При опухолевом росте наблюдается повышение количества Treg-клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺ в периферической крови, что указывает на активацию механизмов иммунной супрессии у онкологических больных.
2. Установлено, что в онкогенезе происходит усиление экспрессии генов TGF- β 1 и FOXP3, которые ассоциированы с супрессорной

активностью Трег-клеток. При этом уровень экспрессии этих генов возрастает по мере прогрессирования опухолевого процесса.

3. Одним из механизмов активации сигнального пути TGF- β при опухолевом росте может быть увеличение секреции TGF- β 1 и снижение экспрессии ингибирующего медиатора Smad7.
4. Применение рекомбинантного IL-2 снижает супрессорное влияние TGF- β 1 и способствует индукции клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺. Таким образом, показана возможность использования экзогенных факторов для модуляции активности TGF- β 1.
5. Полученные данные о функциональном состоянии популяции Трег-клеток в онкогенезе могут быть использованы в комплексной оценке степени иммунной супрессии у онкологических больных.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

KPP	– колоректальный рак
PЖ	– рак желудка
PЛ	– рак лёгкого
PМЖ	– рак молочной железы
ЦТЛ	– цитотоксический Т-лимфоцит
CD	– cell differentiation antigene– антиген кластеров дифференцировки клеток
FOXP3	– транскрипционный фактор forkhead box P3
IL	– interleukin – интерлейкин
Smad	– семейство транскрипционных факторов
TGF- β	– transforming growth factor- β - трансформирующий фактор роста- β
TGF- β RII	– рецептор к TGF- β II типа
Treg	– регуляторный Т-лимфоцит

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Чуров А.В.**, Олейник Е.К., Олейник В.М. TGF- β , регуляторные Т-клетки (Treg) и перспективы терапии онкопатологий // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т.10. – №1. – С. 113.
2. **Чуров А.В.**, Олейник Е.К., Олейник В.М. Анализ экспрессии трансформирующего фактора роста β лимфоцитами периферической крови в онкогенезе // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т.10. – №2. – С. 254.

3. Олейник В.М., Олейник Е.К., **Чуров А.В.** Изучение экспрессии молекулярных маркеров иммунной супрессии FOXP3, TGF- β , T β RII в лимфоцитах периферической крови онкологических больных // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2. – №2-3. – С. 123.
4. Ковчур П.И., Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., **Чуров А.В.**, Олейник В.М. Влияние «Аллокина-альфа» на экспрессию маркеров регуляторных лимфоцитов Treg у больных с хронической папилломавирусной инфекцией // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2009. – Т. 11. – №1. – С. 958 – 961.
5. Ковчур П.И., Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., **Чуров А.В.**, Олейник В.М. Клиническая эффективность «Аллокина-альфа» и его влияние на экспрессию маркеров регуляторных лимфоцитов Treg при лечении больных с хронической ВПЧ-инфекцией // Материалы III регионального научного форума «Мать и дитя». – Саратов, 2009. – С. 127 – 128.
6. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Игнатьев К.С., Олейник В.М., **Чуров А.В.** Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови при раке молочной железы // Материалы XXVI научно-практической конференции хирургов Республики Карелия, посвященной 45-летию хирургического отделения ГУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова» и 45-летию кафедры госпитальной хирургии ГОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет». – Петрозаводск, 2009. – С. 176 – 178.
7. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Ястребова А.В., Олейник В.М., **Чуров А.В.** Изучение иммунного статуса у больных колоректальным раком // Материалы XXVI научно-практической конференции хирургов Республики Карелия, посвященной 45-летию хирургического отделения ГУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова» и 45-летию кафедры госпитальной хирургии ГОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет». – Петрозаводск, 2009. – С. 172 – 175.
8. Олейник Е.К., Олейник В.М., Донников М.Ю., **Чуров А.В.**, Чурова М.В., Герасимова Л.А. Изучение экспрессии IL-4, IL-10, TGF- β лимфоцитами периферической крови онкологических больных // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9. – №2-3. – С. 282.
9. Олейник Е.К., Олейник В.М., **Чуров А.В.** Экспрессия молекулярных маркеров иммунной супрессии FOXP3, TGF- β , TGF- β -RII в лимфоцитах периферической крови у больных с различными иммунными патологиями // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11. – №4-5. – С. 430.
10. Олейник Е.К., Олейник В.М., **Чуров А.В.**, Бахлаев И.Е., Ковчур П.И., Мясников А.А., Балашов А.Т. Экспрессия молекулярных маркеров регуляторных лимфоцитов FOXP3 и TGF- β 1 при вирусных инфекциях, аутоиммунных и онкологических заболеваниях // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2009. – Т. 11. – №1. – С. 1006 – 1009.

11. Олейник Е.К., Олейник В.М., **Чуров А.В.**, Бахлаев И.Е., Мясников А.А., Топчиева Л.В. Регуляторные клетки Treg и иммунотерапия в онкологии // Аллергология и иммунология. – 2008. – №3. – С. 323.
12. **Чуров А.В.** Изучение экспрессии маркеров иммунной супрессии TGF- β 1, CD25 и FOXP3 в лимфоцитах крови онкологических больных // Материалы международной молодежной научной конференции «Ломоносов-2009». – Москва. – 2009. – С. 51 – 52.
13. **Чуров А.В.**, Олейник Е.К., Олейник В.М. TGF- β 1 и регуляторные T-клетки в формировании иммунной супрессии у онкологических больных // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8. – №2. – С. 27 – 30.
14. **Чуров А.В.**, Олейник Е.К., Олейник В.М. Оценка функциональной активности регуляторных T-лимфоцитов у онкологических больных по уровню экспрессии CD25, TGF- β 1 и FOXP3 в лимфоцитах периферической крови у больных с различными иммунными патологиями // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11. – №4-5. – С. 441.
15. **Чуров А.В.**, Олейник Е.К., Олейник В.М. Роль трансформирующего фактора роста β в формировании иммуносупрессии в онкогенезе // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8. – №3. – С. 11 – 15.
16. **Чуров А.В.**, Чурова М.В., Олейник Е.К. Модуляция экспрессии TGF- β у лимфоцитов периферической крови человека при опухолевом росте // Тезисы докладов VI Мол. науч. конф. «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике». – Сыктывкар: УроРАН, 2007.
17. Чурова М.В., **Чуров А.В.**, Олейник Е.К. Влияние ронколейкина на экспрессию интерлейкина-10 при опухолевом росте // Тезисы докладов VI Мол. науч. конф. «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике». – Сыктывкар: УроРАН, 2007.
18. **Чуров А.В.**, Олейник Е.К., Олейник В.М., Шибяев М.И. Содержание CD4⁺CD25^{high} лимфоцитов-супрессоров в периферической крови больных колоректальным раком // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9. – №4. – С. 133 – 134.
19. Олейник Е.К., **Чуров А.В.**, Олейник В.М. Регуляторные лимфоциты и субпопуляции клеток памяти CD4⁺CD45RO⁺ у онкологических больных // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9. – №4. – С. 105 – 106.