

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

И.Б. Жамангарина, М.Р. Патышева, А.А. Андреева

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Ю.Г. Кжышкова

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: inzhu_03.01@mail.ru

**PHENOTYPIC PROFILE OF INFLAMMATORY MONOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF
BREAST CANCER PATIENTS**

I.B. Zhamangarinova, M.R. Patysheva, A.A. Andreeva

Scientific supervisor: Prof., Dr. Yu.Kzhyshkowska

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: inzhu_03.01@mail.ru

***Abstract.** Monocytes as effectors of the innate immunity present an attractive target for diagnostic and therapy of diseases with inflammatory processes. In this work monocytes expressing receptors were determined by flow cytometry. Significant differences of variables received from patient and healthy donors were detected.*

Введение. Моноциты, как эффекторы неспецифического иммунитета, представляют собой перспективную мишень для диагностики и терапевтических манипуляций при заболеваниях, сопровождающихся воспалением. В данной работе были определены моноциты, экспрессирующие рецепторы методом проточной цитофлуориметрии. Были выявлены достоверные отличия исследуемых показателей в сравнении со здоровыми добровольцами. В настоящее время воспаление признается одним из ведущих факторов этиологии и патогенеза РМЖ [1].

В ходе различных стадий патогенеза злокачественных новообразований иммунная система ведёт себя по-разному: она может подавлять распространение опухоли, ингибируя или уничтожая раковые клетки, и способствовать опухолевой прогрессии путем селекции наиболее устойчивых опухолевых клонов и созданию таких условий микроокружения, которые были бы благоприятны для роста раковых клеток [2,]. Следовательно, оценивая функциональное состояние иммунной системы, можно определить риск прогрессирования и исход онкологического заболевания [3,4,]. Клетки моноцитарно-макрофагального происхождения являются одними из центральных эффекторов воспаления. М1 и М2 макрофаги играют важную роль в формировании иммунного ответа в ходе канцерогенеза, и такой процесс как поляризация определяет то, как отреагирует организм на опухоль: будет уничтожать её или способствовать росту. Известно, что М1-макрофаги проявляют свойства эффекторов острой фазы воспаления с выраженной цитотоксической функцией, в том числе, противоопухолевой. М2-макрофаги, активированные по альтернативному пути с участием ИЛ-4 и ИЛ-13, напротив, потенцируют опухолевый рост и способствуют опухолевой прогрессии [5]. Популяционная структура моноцитов ПК (периферическая кровь) определяется уровнем циркулирующих индукторов поляризации М1 и М2 -

интерферона- γ и интерлейкина-4 соответственно, а также чувствительностью к их воздействию, связанной с наличием соответствующих рецепторов.

Принцип метода проточной цитофлуориметрии основан на измерении и оценке флуоресценции и светорассеяния детекторами прибора при прохождении лазерного луча клеткой, находящейся в клеточной суспензии. Для того чтобы каждая клетка могла регистрироваться отдельно, создаётся разница давления в зонде между «обжимающей» образец жидкостью и образцом. Это приводит к тому, что клетки, находясь в ламинарном потоке жидкости, выстраиваются в цепочку друг за другом. В определенном месте клетки пересекают луч света, и происходит считывание информации. В данном случае прибор, помимо измерения основных параметров (размер, соотношение размеров ядра и цитоплазмы, неоднородность или гранулярность цитоплазмы), детектировал комплекс антиген-антитело-флуорофор и выводил полученную информацию на монитор компьютера [6].

Целью работы явилось сравнение M1 и M2 структуры моноцитов ПК и экспрессии ими рецепторов к интерферону- γ (ИФН- γ) и интерлейкину-4 (ИЛ-4) у больных раком молочной железы (РМЖ) в сравнении со здоровыми лицами.

Материалы и методы исследования: В исследование включено 10 пациенток с впервые диагностированным инвазивным РМЖ и 6 здоровых женщин. В периферической крови методом проточной цитофлуориметрии были определены M1 (CD68+), M2 (CD163+) моноциты, а также моноциты, экспрессирующие рецепторы к ИФН- γ (CD119+) и ИЛ-4 (CD124+).

Подготовка проб для анализа происходила в несколько этапов. В пробирку для цитометра со 100 мкл цельной венозной гепаринизированной крови добавляли моноклональные антитела (BD Pharmingen™, USA) для поверхностного окрашивания, как показано в табл. 1.

Таблица 1

Антитела для фенотипа моноцитов

Антитела \ № пробирки	1	2	3
FITC Mouse Anti-Human CD68	2 мкл	2 мкл	2 мкл
PE Mouse Anti-Human CD163	5 мкл	–	–
PE Mouse Anti-Human CD119	–	2мкл	
PE Mouse Anti-Human CD124	–	-	5мкл

Так как для CD68 и CD163 используется один флуорофор – фикоэритрин (PE), то измерять эти антигены нужно было в двух отдельных пробирках. Необходимо заметить, что параллельно с «окрашенными» пробирками была одна «неокрашенная», то есть та, с которой происходили все те же манипуляции, что и с остальными двумя, кроме добавления моноклональных антител (табл. 1).

После добавления антител пробирки инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем проводилось лизирование эритроцитов путем добавления 900 мкл рабочего лизирующего раствора, который готовился из концентрированного BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, USA) добавлением дистиллированной воды из соотношения 1:10. После – повторная

инкубация в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут. По окончании инкубации проводилась отмывка: в пробирку вносили 2 мл раствора BD Cell Wash (BD Biosciences, USA), полученный раствор перемешивался, а затем центрифугировался в течение 5 минут при 3000 оборотах. После центрифугирования надосадок сливался, и проводилась повторная отмывка по той же схеме. Финальным этапом являлось добавление 450 мкл раствора FACStflow (BD Biosciences, USA) в каждую из четырёх пробирок к полученному осадку. Затем происходило непосредственное измерение на проточном цитометре FACSCanto II (BD Biosciences, USA). Причём первой проходило измерение «неокрашенная» пробирка для последующей оценки образцов с флюорохромами.

Данные о соотношении субпопуляций моноцитов измерялись в процентном соотношении от всего пула моноцитов периферической крови и были получены с помощью программного обеспечения Diva (BD Biosciences, USA), а затем полученные цифры переводились в абсолютные значения.

Результаты. В проведенном исследовании содержание провоспалительных M1 (CD68⁺) моноцитов и моноцитов, экспрессирующих рецепторы к ИФН- γ – индуктору M1-поляризации, не имело статистически значимых различий у здоровых лиц и у больных РМЖ. Однако количество противовоспалительных M2 (CD163⁺) моноцитов и моноцитов, экспрессирующих рецептор к индуктору M2-поляризации ИЛ-4, в ПК у больных РМЖ было ниже в 22 и в 8 раза по сравнению с соответствующими показателями у здоровых лиц ($p < 0,05$).

Заключение. В отличие от здоровых лиц у больных РМЖ в ПК снижен уровень M2 моноцитов и моноцитов, чувствительных к действию M2-индуктора ИЛ-4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ben-Baruch, A. (2012) The Tumor-Promoting Flow of Cells Into, Within and Out of the Tumor Site: Regulation by the Inflammatory Axis of TNF α and Chemokines. *Cancer Microenvironment*, no.5 (2), pp. 151-164.
2. Стахеева М. Н., Д. Эйдензон, Е. М., Слонимская и др. Взаимосвязь состояния иммунной системы как интегрированного целого с клиническим течением рака молочной железы //Сибирский онкологический журнал. – 2011. – № 2. – С. 11–19.
3. Whiteside, T. L. (2013) Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis. *Frontiers in Oncology*, no. 3, pp. 1-8
4. Lippitz, B. E. (2013) Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *The Lancet Oncology*, no. 6, pp. 218–228.
5. Sica, A., Mantovani, A. (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, no. 122(3), pp. 787-795.
6. Хайдуков, С.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине // Медицинская иммунология. – 2007. – № 4-5. – С. 373–378.