

АДАМ ЖӘНЕ
ЖАНУАРЛАР
ФИЗИОЛОГИЯСЫ

ФИЗИОЛОГИЯ
ЧЕЛОВЕКА
И ЖИВОТНЫХ

HUMAN
AND ANIMAL
PHYSIOLOGY

УДК 616:579.61

Н.Ш. Акимбеков*,
А.К. Сагинова, К.Т. Тастамбек,
Г.Ж. Абдиева, П.С. Уалиева, Г.К. Кайырманова,
А.Е. Кадыржанова, А.А. Жубанова

Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
Республика Казахстан, г. Алматы

*E-mail: akimbekov.nuraly@kaznu.kz

**Использование куриных эмбрионов
в качестве модели в экспериментах
по изучению пирогенной активности эндотоксина**

В данной работе в лабораторных исследованиях для раскрытия механизма воздействия эндотоксина на развитие эмбрионов использовали куриные зародыши. Установлены особенности и степень влияния коммерческих препаратов ЛПС и ЛПС (липополисахарид), полученных из бесклеточной суспензии грамотрицательных бактерий, на показатели выживаемости и пирогенности при однократном введении куриному эмбриону в зависимости от периода онтогенеза. Получены данные о нивелирующем действии наноструктурированного сорбента КРШ (карбонизованная рисовая шелуха) в отношении ЛПС (липополисахарид). Результаты экспериментов по изучению пирогенного действия ЛПС (липополисахарид) различного происхождения на куриные эмбрионы свидетельствуют о том, что введение суспензии ЛПС приводит к гипертермии (в среднем 2,7°C) и гибели (в среднем 19%) в сравнении с обработанными КРШ и контрольными группами.

Ключевые слова: эндотоксин, пирогенность, куриные эмбрионы, сорбент, элиминация.

N.Sh. Akimbekov, A.K. Sagynova, K.T. Tastambek,
G.Zh. Abdieva, P.S. Ualieva, G.K. Kaiyrmanova, A.E. Kadyrzhanova, A.A. Zhubanova

**Using the chick embryo as a model experiments on
the pyrogenic activity of an endotoxin**

In this paper, in laboratory studies to uncover mechanisms of action of endotoxin on the development of embryos used chicken embryos. The features and the degree of influence of commercial preparations of LPS and LPS (lipopolysaccharide) derived from cell-free suspension of gram-negative bacteria on the survival and pyrogenicity after a single dose of chick embryos vary depending on the period of ontogenesis. Data were obtained on levellers action nanostructured sorbent krs (carbonized rice husk) in respect of LPS (lipopolysaccharide). Results of experiments on the action of pyrogenic LPS (lipopolysaccharide) of different origin for chicken embryos indicate that administration of LPS suspension leads to hyperthermia (average 2,7 ° C) and mortality (19% on average) compared to control and treated KRS groups.

Key words: endotoxin, pyrogenicity, chicken embryos, sorbent, elimination.

Н.Ш. Акимбеков, А.Қ. Сағынова, Қ.Т. Тастамбек,
Г.Ж. Абдиева, П.С. Уәлиева, Г.Қ. Қайырманова, А.Е. Қадыржанова, А.А. Жұбанова
**Тауық эмбриондарын эндотоксиннің
пирогенді активтілігін зерттеу тәжірибелерінде модель ретінде қолдану**

Бұл жұмыста эндотоксиннің эмбрион дамуына әсер ету механизмін байқау үшін лабораториялық зерттеуге тауық ұрықтары пайдаланылды. Тауық ұрықтарына коммерциялық ЛПС (липополисахарид) және грамм теріс бактерияларынан бөліп алынған жасушасыз ЛПС-тің (липополисахарид) онтогенез сатысына пирогенді әсері зерттелді. ЛПС-пен (липополисахарид) бірлескен ниверлеуші наноқұрылымды сорбент ККҚ-ның (карбонизделген күріш қауызы) әсер ету нәтижелері алынды. Тәжірибе нәтижесінде әртүрлі күйдегі ЛПС суспензиясының пирогенді әсері бақылау және ККҚ-мен өңделген топтармен салыстырғанда гипертермияға (орташа 2,7°C) және олардың өліміне (орташа 19°C) әкеліп соғатынын көрсетті.

Түйін сөздер: эндотоксин, пирогенділік, тауық эмбриондары, сорбент, элиминация.

Наиболее адекватной моделью, позволяющей в динамике изучить у позвоночных закономерности преобразований на протяжении эмбриогенеза без ущерба для материнского организма, являются эмбрионы птиц. Их особенностью является доступность и управляемость в процессе эксперимента, возможность получения и фиксирования результатов практически с помощью всех известных методов: эмбриологических, пирогенных, гистологических, цитологических, генетических, биохимических, гематологических, микрохирургических и многих других.

Работа с куриным эмбрионом как объектом промышленного инкубирования сопровождается неизбежными потерями, но они не противостоят принципам биоэтики и, в отличие от работы с эмбрионами млекопитающих и человека, она может быть реализована на любом этапе онтогенеза, являющемся предметом интереса исследователя [1]. Одним из малоизученных и интересных аспектов развития куриного эмбриона является изучение особенностей его реакции на введение эндотоксина различного происхождения. Имеются данные литературы [2-4], свидетельствующие о специфике реагирования куриного эмбриона на ЛПС (липополисахарид): пирогенность, летальность, признаки гиперчувствительности замедленного типа и др.

Однако сведения об исследованиях, связанных с изучением особенностей развития, в том числе пирогенных показателей зародышей под действием элиминированных сорбентами ЛПС (липополисахарид), в доступной литературе не встречались.

В связи с этим изучение особенностей развития и гипертермии эмбриона в процессе экспериментального воздействия ЛПС (Липополисахарид), обработанного КРШ (карбонизованная рисовая шелуха), и коммерческого эндотоксина представляется крайне актуальным.

Материалы и методы

Материалы и методы

Материалом для исследования *in vivo* послужили куриные эмбрионы на разных стадиях эмбрионального развития, которые использовались для получения сведений о пирогенной активности коммерческих препаратов ЛПС и ЛПС, полученного из бесклеточной суспензии грамотрицательных бактерий, а также о нивелирующем действии наноструктурированного сорбента КРШ в отношении ЛПС.

В ходе экспериментальной работы по исследованию влияния ЛПС на развитие куриных эмбрион использовали оплодотворенные яйца яйценосной породы кур. Отбирали яйца от здоровых кур одинаковой величины и массы (в среднем 50±5 г) в количестве 266 штук.

Инкубацию осуществляли в условиях лаборатории при температуре 38±2°C и относительной влажности 80% в бытовом инкубаторе «БИ1» (Россия, 2012) в соответствии с инструкцией его изготовителя.

Введение суспензии, содержащей ЛПС (липополисахарид), производили однократно в период интенсивного роста и развития зародыша, на 16-е сутки инкубации. Так как в качестве источника питательных веществ в установленные периоды развития эмбрион использует именно желток, место введения приходилось в область расположения желточного мешка.

Для установления необходимой концентрации ЛПС, обеспечивающей выживаемость куриного эмбриона, было создано 7 рабочих групп зародышей, которым в установленные периоды

развития в желточный мешок вводили ЛПС в различных концентрациях.

С помощью прибора контроля качества яиц контролировали уровень развития зародышей на различных этапах инкубации.

Для проведения опытов были сформировано две экспериментальные группы:

I – контрольные эмбрионы;

II – опытные эмбрионы, зародышам которых на 16-е сутки эмбриогенеза вводили в желточный мешок суспензии ЛПС. Они были разделены на 5 групп:

Первая группа – ЛПС (коммерческий) вводили в дозе 0,1 мл, в концентрации 1:10000 (экспериментальная группа 1 – ЭГ 1).

Вторая группа – ЛПС (выделенный нами) вводили в дозе 0,1 мл и концентрации 1:10000 (экспериментальная группа 2 – ЭГ 2).

Третья группа – ЛПС (выделенный нами и обработанный КРШ) вводили в концентрации 1:10000 (экспериментальная группа 3 – ЭГ 3).

Четвертая группа – ЛПС (коммерческий) вводили в концентрации 1:100000 (экспериментальная группа 4 – ЭГ 4).

Пятая группа – ЛПС (выделенный нами) вводили в концентрации 1:100000 (экспериментальная группа 5 – ЭГ 5).

Шестая группа – ЛПС (выделенный нами и обработанный КРШ) в концентрации 1:100000 (экспериментальная группа 6 – ЭГ 6).

Такая постановка экспериментов позволила проследить продолжительность жизни куриных эмбрионов вплоть до вылупления и определить с концентрацией вводимого эндотоксина.

Для дезинфекции поверхности яйца использовали 5% спиртовой раствор йода. Раствор йода наносили на поверхность яйца диаметром 2 см. Место обработки приблизительно приходилось на область нахождения желточного мешка.

Процесс введения суспензии ЛПС осуществляли в стерильных условиях. Бокс обрабатывали раствором фенола и облучением УФ до работы. Введение эндотоксина различного происхождения производили с использованием портативного овоскопа и подготовленного стерильного оборудования.

В связи с малыми объемами вводимой суспензии, содержащей ЛПС, использовались инсулиновые шприцы. После извлечения из яйца иглы отверстие на поверхности яйца заливали парафином и продолжали инкубацию.

Для измерения температуры использовали высокоточный медицинский термометр с ценой деления 0,1°C. Устройство, чувствительное

к температуре, вводили в эмбрион на глубину около 2 см и оставляли его введенным до достижения максимальной температуры.

Результаты и их обсуждение

Суспензии, содержащие эндотоксин различного происхождения, считали непирогенными, если сумма повышения температуры у групп зародышей была меньше или равнялась 1°C; если эта сумма превышала 2°C – ЛПС считали пирогенным [5].

Изменение пирогенных показателей куриных зародышей на 16 и 19 сутки свидетельствует о нарушении процессов терморегуляции организма.

Из таблицы 3 видно, что температура эмбриона на 16 сутки при введении растворов коммерческий ЛПС (ЭГ 1) составляет 35,5°C, тогда как в контрольный этот показатель равен 33,9°C. Показатель температуры куриных зародышей группы, получившей ЛПС, выделенный нами, заметно превышает (37,7°C) аналогичный показатель у контрольной группы, тогда как у зародышей, получивших ЛПС, обработанный КРШ, этот показатель ближе к контрольному.

Нарушение суточных ритмов терморегуляции наблюдается и на 19 сутки после введения суспензий ЛПС (липополисахарид) у экспериментальных групп.

При введении эмбрионам минимальной концентрации растворов ЛПС (липополисахарид) (ЭГ 4 и ЭГ 5) повышение температуры сильно не наблюдалось, что может свидетельствовать об отсутствии пирогенного действия ЛПС (липополисахарид) в исследованной концентрации.

У эмбрионов после контакта с ЛПС (липополисахарид) различного происхождения происходит значительное изменение показателей температуры тела, которое в среднем составляет $36,5 \pm 0,4$, тогда как в контрольной группе и в группе, в которой действие ЛПС (липополисахарид) было нивелировано наноструктурированным сорбентом КРШ (карбонизованная рисовая шелуха), величина этого показателя составляла $33,9 \pm 0,2$. Таким образом, цитохимические, гистологические и пирогенные показатели куриных эмбрионов под влиянием суспензии ЛПС (липополисахарид) различного происхождения свидетельствуют о развитии у них воспалительной реакции, выраженных отклонениях в развитии. Совместное введение ЛПС с КРШ (карбонизованная рисовая шелуха) заметно снижает отрицательное действие ЛПС (липополисахарид) на эти показатели.

Таблица 1 – Изменение температуры куриных эмбрионов после введения суспензий ЛПС

Группы зародышей	Температура эмбриона (°С), 16 суток инкубации	Температура эмбриона (°С), 19 суток инкубации
Контроль	33,9±0,2	34,3±0,2
ЭГ 1	35,5±0,3	35,9±0,4
ЭГ 2	37,7±0,4	35,3±0,2
ЭГ 3	33,2±0,5	34,2±0,2
ЭГ 4	34,7±0,5	35,5±0,3
ЭГ 5	34,2±0,3	35,3±0,4
ЭГ 6	34 ±0,2	34,2±0,3

При однократном введении суспензий ЛПС (липополисахарид) в желточный мешок выживаемость зародышей на 16-е сутки составляет 79,88% от общего числа заложенных яиц, а на 19 сутки этот показатель составляет 83,91%.

Результаты исследования максимальных концентраций ЛПС (1:10000) свидетельствуют

о том, что введение коммерческой ЛПС эмбриону на 15-е сутки вызывает летальный исход среди эмбрионов в течение 23-25 часов у 76% зародышей; ЛПС выделенный нами – 72%; ЛПС обработанный КРШ – 83% соответственно. В минимальных концентрациях этот показатель выше.

Таблица 2 – Выживаемость зародышей в норме и при введении разных суспензий ЛПС (липополисахарид) на 15-е сутки

Число эмбрионов в группах	Срок введения суспензий ЛПС, 15 суток инкубации	Срок учета показателей, 16 суток инкубации	Количество выживших эмбрионов, %
Контроль (n=29)	29	29	100
ЭГ 1 (n=29)	29	22	75,86
ЭГ 2(n=29)	29	21	72,41
ЭГ 3(n=29)	29	24	82,76
ЭГ 4(n=29)	29	23	79,31
ЭГ 5(n=29)	29	22	75,86
ЭГ 6(n=29)	29	27	93,10

Таблица 3 – Выживаемость зародышей в норме и при введении разных суспензий ЛПС (липополисахарид) на 18-е сутки

Число эмбрионов в группах	Срок введения суспензий ЛПС, 18 суток инкубации	Срок учета показателей, 19 суток инкубации	Количество выживших эмбрионов, %
Контроль (n=29)	29	28	96,55
ЭГ 1 (n=29)	29	23	79,31
ЭГ 2(n=29)	29	22	75,86
ЭГ 3(n=29)	29	26	89,65
ЭГ 4(n=29)	29	25	86,21
ЭГ 5(n=29)	29	24	82,76
ЭГ 6(n=29)	29	26	89,65

Введение куриным эмбрионам суспензий коммерческий ЛПС (липополисахарид) в максимальной концентрации на 18-е сутки приводит к снижению уровня выживаемости к 19-м суткам по сравнению с контролем на 17%; ЛПС (липополисахарид), выделенный нами – на 21%; ЛПС, обработанный КРШ (карбонизованная рисовая шелуха), – на 7%, что свидетельствует об эффективной сорбции эндотоксина на КРШ (карбонизованная рисовая шелуха).

Установлены особенности и степень влияния коммерческих препаратов ЛПС и ЛПС (липополисахарид), полученных из бесклеточной суспензии грамотрицательных бактерий, на показатели

выживаемости и пирогенности при однократном введении куриному эмбриону в зависимости от периода онтогенеза. Получены данные о нивелирующем действии наноструктурированного сорбента КРШ (карбонизованная рисовая шелуха) в отношении ЛПС (липополисахарид).

Результаты, полученные при изучении динамики изменения морфометрических и пирогенных показателей развития куриного зародыша *in vivo* под влиянием суспензий ЛПС (липополисахарид) различного происхождения, могут быть использованы в научных целях и при составлении учебных материалов по биотехнологии и биологии.

Литература

- 1 Трунова А.П. Особенности развития и иммуногенез куриного эмбриона под влиянием амброзийного антигена: диссертация: химия и биология // Биотехнология. – Ставрополь, 2008. – С. 181.
- 2 Dudek K., Bednarek D. Cellular immune response of pigeons in the conditions of endotoxin fever and pyrogenic tolerance // Polish Journal of Veterinary Sciences. – 2011. – №1. – P. 127-133.
- 3 Baert K., Duchateau L., De Boever S., Cherlet M., De Backer P. Antipyretic effect of oral sodium salicylate after an intravenous *E. coli* LPS injection in broiler chickens//Br Poult Science article. – 2005. – 46. – P. 137-143.
- 4 Dudek K., Bednarek D., Soszynski D., Kozłowska M. Changes of internal temperature and locomotor activity in the condition so fendotoxin fever, pyrogenic tolerance andits suppression in pigeons // Medycyna Wet. – 2010. – 67 – P. 38-47.
- 5 Машковский М.Д., Бабаян Э.А., Обоймакова А.Н., Булаев В.М. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – 11-е изд. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

References

- 1 Trunova A.P. Osobennosti razvitija i immunogenez kurinogo jembriona pod vlijaniem ambrozijnogo antigena: dissertacija: himija i biologija // Biotehnologija. – Stavropol', 2008. – S. 181.
- 2 Dudek K., Bednarek D. Cellular immune response of pigeons in the conditions of endotoxin fever and pyrogenic tolerance // Polish Journal of Veterinary Sciences. – 2011. – №1. – P. 127-133.
- 3 Baert K., Duchateau L., De Boever S., Cherlet M., De Backer P. Antipyretic effect of oral sodium salicylate after an intravenous *E. coli* LPS injection in broiler chickens//Br Poult Science article. – 2005. – 46. – P. 137-143.
- 4 Dudek K., Bednarek D., Soszynski D., Kozłowska M. Changes of internal temperature and locomotor activity in the condition so fendotoxin fever, pyrogenic tolerance andits suppression in pigeons // Medycyna Wet. – 2010. – 67 – P. 38-47.
- 5 Mashkovskij M.D., Babajan Je.A., Obojmakova A.N., Bulaev V.M. Gosudarstvennaja farmakopeja SSSR: Vyp. 2. Obshhie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. – 11-e izd. – M.: Medicina, 1989. – 400 s.

УДК 577.083.3;612.017.1;577.27

¹Е.О. Остапчук*, ¹Ю.В. Перфильева,
¹Н. Абдолла, ¹Р.Т. Тлеулиева, ¹О.Ю. Юрикова, ¹И.А. Оскольченко,
²Ш.Ж. Талаева, ²Н.А. Омарбаева, ¹Н.Н. Беляев

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина,
Республика Казахстан, г. Алматы

²Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии,
Республика Казахстан, г. Алматы

*E-mail: katyostapchuk@gmail.com

Экспрессия IL-10 и TGF- β цитокинов натуральными киллерными клетками больных раком молочной железы

Натуральные киллерные клетки (НК) традиционно рассматриваются как цитотоксические эффекторные лимфоциты, обладающие способностью уничтожать инфицированные или трансформированные клетки организма. В последнее время НК рассматривают как клетки, участвующие в иммунорегуляции путем продукции цитокинов и через межклеточные взаимодействия. Ранее было показано, что НК-клетки здоровых доноров содержат минорную популяцию клеток, экспрессирующих IL-10 и TGF- β , которые, в свою очередь, оказывают супрессорное влияние на компоненты врожденного и приобретенного иммунитета. Учитывая важность иммунорегуляторных клеток в развитии злокачественных новообразований, мы исследовали пул циркулирующих НК-клеток, продуцирующих супрессорные цитокины, у больных раком молочной железы. Нами было выявлено увеличение уровня IL-10⁺ и TGF- β ⁺ НК-клеток в периферической крови больных, по сравнению со здоровыми донорами. Полученные данные позволяют предположить, что НК-клетки при развитии рака молочной железы приобретают повышенную иммуносупрессорную активность и могут участвовать в подавлении противоопухолевого иммунитета.

Ключевые слова: НК-клетки, рак молочной железы, IL-10, TGF- β .

Ye.O. Ostapchuk, Yu.V. Perfilyeva,
N. Abdolla, R.T. Tleylieva, O.Yu. Yurikova, I.A. Oskolchenko,
Sh.G. Talaeva, N.A. Omarbaeva, N.N. Belyaev

Expression of IL-10 and TGF- β by natural killer cells in breast cancer patients

NK cells had been traditionally considered as cytotoxic effector cells rapidly killing infected and transformed cells. Recent evidence has suggested that NK cells have immune regulatory effect by secreting various cytokines or cell-to-cell contact. It has been recently shown that NK cells contain a trace amount of cells expressing intracellular IL-10 and TGF- β , which can exert suppressive influence upon innate and adaptive immunity. Taking into consideration the importance of circulating immunoregulatory compartment in tumor progression, levels of NK cells expressing suppressive cytokines were investigated in the peripheral blood of breast patients. We found that in breast cancer patients circulating NK cells contained increased number of IL-10⁺ and TGF- β ⁺ cells compared to healthy donors. The findings support the assumption that under breast cancer NK cells acquire increased immunosuppressive activity and can play a role in suppression of anti-tumor immunity.

Key words: NK cells, breast cancer, IL-10, TGF- β .

Е.О. Остапчук, Ю.В. Перфильева, Н. Абдолла,
Р.Т. Тлеулиева, О.Ю. Юрикова, И.А. Оскольчинко, Ш.Ж. Талаева,
Н.А. Омарбаева, Н.Н. Беляев

Сүт безі ісігі ауруларының табиғи киллер жасушаларындағы IL-10 және TGF- β экспрессиясы

Табиғи киллер жасушалары әдетте ағзадағы инфицирленген немесе трансформацияланған жасушаларды өлтіруге қабілетті цитотоксикалық эффекторлы лимфоциттер ретінде қарастырылады. Соңғы уақыттарда, НК-жасушалары цитокиндер продукциясы мен жасушааралық әрекеті арқылы иммундық регуляциясына қатысы бар деп саналады. Осыған дейін сау донорлардың НК-жасушалары арасында IL-10 және TGF- β экспрессиялайтын минорды популяциясы табылады, ол өз ретінде туа біткен және жүре болған иммунитеттің компоненттеріне суппресорлық әсер ететіні анықталды. Иммунорегуляторды жасушалардың қатерлі ісіктерінің өсуіне қатысу маңыздылығын есепке алып, біз суппресорлық цитокиндерді бөліп шығаратын сүт безі ісігі ауру пациенттерінің айналымдағы НК-жасушаларының санын зерттедік. Сау донорлармен салыстырып қарағанда ауру адамдардың шеткі аймақтық қандағы IL-10⁺ және TGF- β ⁺ НК-жасушаларының проценттік деңгейінің жоғарлайтындығын анықтадық. Алынған мәліметтерден сүт безі ісігі кезіндегі НК-жасушалар жоғары иммуно-суппресорлық активтілікке ие болып, ісікке қарсы иммунитеттің басылуына қатысуы мүмкін екендігі болжанады.

Түйін сөздер: табиғи киллер жасушалар, сүт безі ісігі, IL-10, TGF- β .

Введение

Согласно современной концепции иммунологии, цитокины играют важную роль в развитии злокачественных новообразований, модулируя активность иммунных клеток. Интерлейкин-10 (IL-10) и трансформирующий фактор роста- β (TGF- β) являются иммунорегуляторными цитокинами, обладающими противовоспалительными и суппресорными свойствами. Уровень данных цитокинов увеличен в сыворотке и опухолевой ткани при раке молочной железы [1, 2]. Ранее было показано, что у трансгенных мышей с нокаутом гена IL-10 наблюдалась повышенная элиминация опухоли и выживаемость, по сравнению с контрольными животными [3]. Известно, что IL-10 ингибирует пролиферацию, активацию, продукцию цитокинов и цитотоксичность НК-клеток. Эндогенный и экзогенный TGF- β подавляет цитотоксичность, секрецию IFN γ и экспрессию NKG2D и NKp30 на НК-клетках [4-8].

Регуляторную и суппресорную функцию НК-клеток традиционно связывают с цитокиновой продукцией [9]. Так, ранее была описана продукция IL-10 и TGF- β малочисленными популяциями НК-клеток человека [10]. IL-10-продуцирующие НК-клетки были охарактеризованы как иммуносуппресорные, т.к. они подавляли пролиферацию и продукцию IFN γ антиген-специфическими Т-лимфоцитами. Данная субпопуляция НК-клеток экспрессиро-

вала повышенный уровень мРНК IL-10, низкий уровень мРНК TGF- β и IL-13 и не экспрессировала IFN γ [11]. М. Giuliani с соавт. получили в условиях *in vitro* регуляторные НК-клетки (NKP_{SG}) из CD34⁺ гемопоэтических клеток-предшественников периферической крови, экспрессирующих мембрансвязанный IL-15 [12]. NKP_{SG} обладали фенотипом зрелых НК, секретировали суппресорные молекулы, такие, как IL-10, IL-21 и HLA-G, подавляли функции зрелых дендритных клеток и цитотоксическую активность НК-клеток периферической крови, а также не обладали способностью к цитолизу клеток-мишеней [12]. Кроме этого, увеличенный процент IL-10-секретирующих НК-клеток был показан в периферической крови и децидуальной оболочке на ранних стадиях беременности, в сравнении со случаями спонтанных аборт [13] и у женщин во время фолликулярной фазы овариального цикла [14]. Эти данные свидетельствуют о наличии регуляторных свойств IL-10-секретирующих НК-клеток и их участия в обеспечении иммунной толерантности к плоду. Тем не менее IL-10- и TGF- β -продуцирующие НК-клетки до сих пор не были изучены при раке.

Учитывая важность иммунорегуляторного пула НК-клеток в развитии опухоли, мы исследовали субпопуляцию IL-10- и TGF- β -продуцирующих НК-клеток в периферической крови больных раком молочной железы (РМЖ) на разных стадиях заболевания.

Материалы и методы

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови. В ходе исследования использовали венозную кровь (10 мл), стабилизированную ЭДТА (2 мг/мл), здоровых женщин (ср. возраст – $39,5 \pm 14,8$, $n=17$) и первичных больных с операбельным РМЖ и отсутствием метастазов (ср. возраст – $53,0 \pm 14,5$, $n=21$) в основном на II стадии заболевания (I стадия $n=3$, II стадия $n=14$, III стадия $n=4$). Исследование было одобрено этическим комитетом Казахского научно-исследовательского института онкологии и радиологии, и все доноры дали свое информированное согласие. Мононуклеарные клетки выделяли центрифугированием на одноступенчатом градиенте плотности Nystopaque ($\rho=1,077$ г/мл) и отмывали средой RPMI-1640.

Антитела и реактивы. В ходе постановки экспериментов использовали следующие реактивы: среда RPMI-1640, L-глутамин, пенициллин/стрептомицин, фетальная телячья сыворотка (ФТС), фитогемаглютинин (ФГА) М, Nystopaque-1077 (Sigma-Aldrich, США), Brefeldin A (Biolegend, США). Следующие антитела были использованы для проточной цитофлуориметрии: anti-CD3-FITC (Miltenyi Biotec, Германия), anti-CD56-PerCP (Biolegend, США), anti-IL-10-PE и anti-TGF- β -PE (R&D Systems, США).

Культивирование клеток. Мононуклеарные клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% ФТС, 2 мМ глутамина, 100 U/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина в течение 18 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 , без стимуляции (НС) или с добавлением ФГА-М (10 $\mu\text{l/ml}$). По истечении 1 ч инкубации к культурам клеток добавляли Brefeldin A (1 $\mu\text{l/ml}$) для предотвращения секреции цитокинов. Концентрация клеток в культурах составляла 2×10^6 кл./мл.

Проточная цитофлуориметрия. Экспрессию IL-10 и TGF- β оценивали методом проточной цитофлуориметрии, анализируя мононуклеарные клетки в гейте НК-клеток (CD3 $^+$ CD56 $^+$). Мечение проводили путем инкубации клеток в присутствии антител, связывающихся с поверхностными маркерами (5 мкл антител на 100 мкл клеточной суспензии) в течение 10 мин при $4-8^\circ\text{C}$ в темноте. Далее проводили фиксацию и пермеабиллизацию клеточной мембраны добавлением раствора Fixation/Permeabilization (BD Biosciences, США) в объеме 500 мкл на количество клеток, не превышающее 10^6 . Затем клеточную суспензию перемешивали и инкуби-

ровали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. После этого клетки отмывали буферным раствором Perm/Wash (BD Biosciences, USA) и метили антителами против цитокинов, после чего клетки отмывали, ресуспендировали в проточной жидкости и анализировали на FACSCalibur (BD Biosciences, США).

Статистический анализ. Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартные отклонения. Статистическую достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при уровне значимости p не более 0,05.

Результаты и их обсуждение

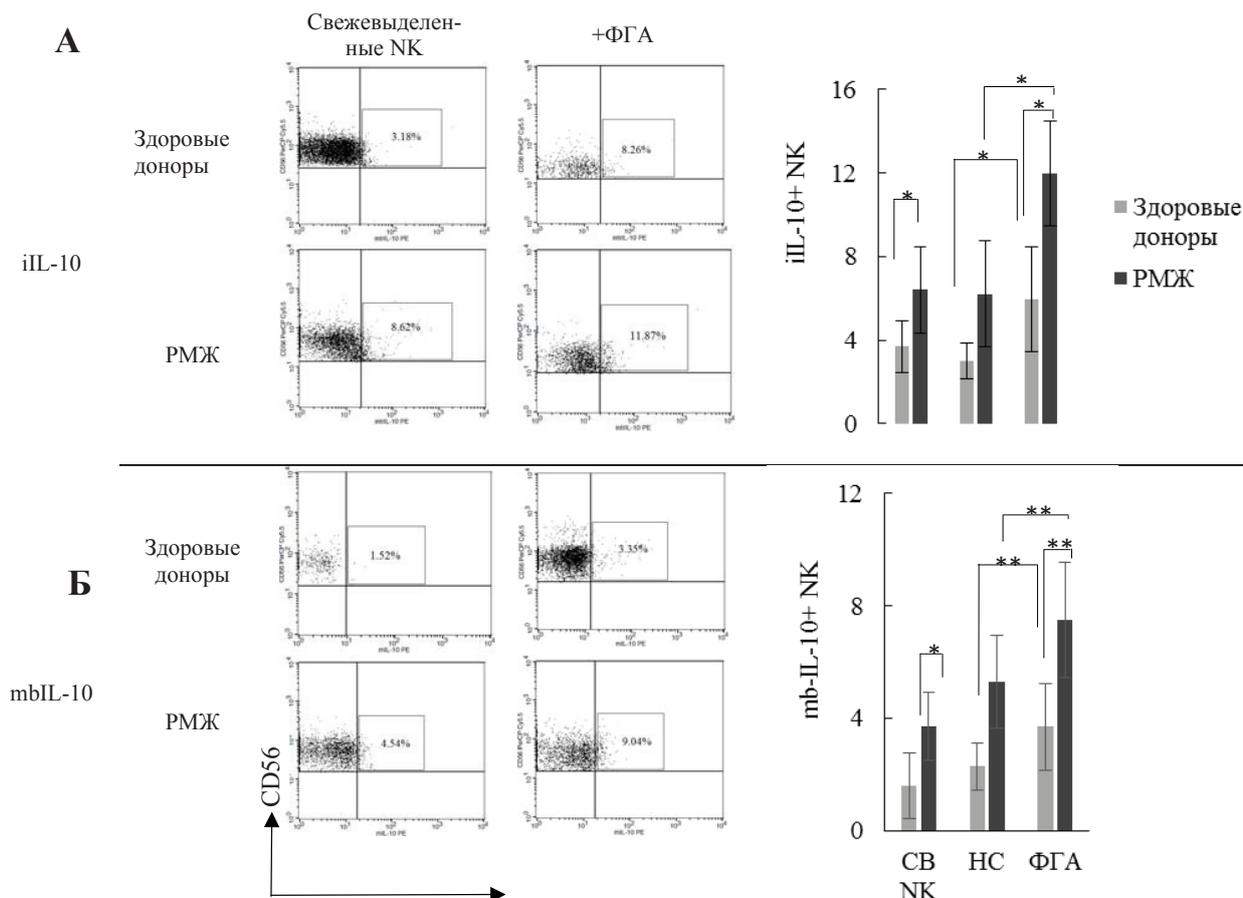
1. *Периферическая кровь больных раком молочной железы содержит повышенный процент IL-10-продуцирующих НК-клеток.* В ходе исследования нами было обнаружено, что свежeweделенные мононуклеарные клетки периферической крови больных РМЖ содержат в сравнении со здоровыми женщинами повышенный процент НК-клеток, экспрессирующих внутриклеточный IL-10 (iIL-10), ($6,4 \pm 2,0$; $3,7 \pm 1,2$; $p < 0,0005$, соответственно) (рис. 1).

М. Giuliani и др. показали, что супрессорные НК $_{\text{SG}}$ -клетки экспрессировали мембрансвязанную форму IL-10 [12]. Мы обнаружили, что незначительная часть НК-клеток здоровых доноров экспрессирует мембрансвязанный IL-10 (mbIL-10) ($1,6 \pm 1,1$; $n=17$). У больных РМЖ процент mbIL-10 $^+$ НК-клеток оказался достоверно выше ($3,7 \pm 1,2$; $p < 0,0001$) (рис. 1). Следует отметить, что мы не применяли метод кислотных смывов для изучения mbIL-10 на НК-клетках, поэтому остается неясным, закорен ли mbIL-10 непосредственно через мембрану или данный цитокин связан с клеткой через специфический рецептор.

Ранее было показано, что уже после 2 ч стимуляции ФГА в сочетании с IL-2 продукция IL-10 и экспрессия *mPHK IL-10* в НК-клетках повышается [11]. Количество IL-10-экспрессирующих CD3 $^+$ CD56 $^+$ НК-клеток было оценено нами после 18 ч стимуляции ФГА. Полученные результаты показали, что ФГА значительно усиливает экспрессию iIL-10 НК-клетками здоровых доноров и больных РМЖ, в сравнении с нестимулированными клетками (рис. 1). При этом процент ФГА-стимулированных НК-клеток, экспрессирующих iIL-10, был значительно выше у больных РМЖ, по сравнению со здоровыми донорами ($11,9 \pm 2,5$; $5,9 \pm 2,5$, соответст-

венно, $p < 0,0005$) (рис. 1). После стимуляции ФГА мы наблюдали увеличение $mbIL-10^+$ NK-клеток по отношению к нестимулированным клеткам в группе здоровых женщин ($3,6 \pm 1,5$; $2,3 \pm 0,8$, соответственно, $p < 0,01$) (рис. 1). Аналогично здоровым донорам, уровень $mbIL-10^+$ NK-клеток больных РМЖ увеличивался в ответ на воздействие ФГА, в сравнении с нестимулированными клетками ($7,5 \pm 2,0$; $5,3 \pm 1,6$, соот-

ветственно, $p = 0,01$) (рис. 1). При этом процент $mbIL-10^+$ NK-клеток РМЖ был выше, чем в группе здоровых женщин как в свежеевыделенной мононуклеарной фракции, так и после активации ФГА (рис. 1). Мы не обнаружили статистически значимой зависимости экспрессии IL-10 NK-клетками от стадии заболевания РМЖ как в свежеевыделенных, так и в активированных мононуклеарах периферической крови.



Примечание: данные представлены в виде средней и стандартного отклонения, достоверность отличий: * – $p < 0,0005$; ** – $p \leq 0,01$

Рисунок 1 – Содержание $iIL-10^+$ (А) и $mbIL-10^+$ (Б) NK-клеток в свежеевыделенных (CB NK), нестимулированных (НС) и активированных ФГА мононуклеарах периферической крови здоровых доноров и больных раком молочной железы (РМЖ). Представлены репрезентативные результаты и обобщенные данные для каждой из исследованных групп.

2. Процент TGF-в⁺ NK-клеток повышен у больных раком молочной железы. Как показано на рисунке 2, количество NK-клеток, экспрессирующих внутриклеточный TGF-в ($iTGF-в$), было повышено у больных РМЖ, в сравнении со здоровыми женщинами ($6,6 \pm 2,6$; $3,6 \pm 1,7$, соответственно, $p = 0,001$). Стимуляция ФГА повы-

шала количество NK-клеток, экспрессирующих $iTGF-в$, во всех исследуемых группах (рис. 2). При этом увеличенный процент $iTGF-в^+$ NK в группе больных сохранялся после инкубации без стимуляции и в присутствии ФГА (рис. 2).

Наличие мембранассоциированной формы TGF-в на T-регуляторных лимфоцитах и ее суп-

рессорный эффект были описаны ранее [15]. Мы предположили, что НК-клетки также могут презентировать TGF-в на своей поверхности (mbTGF-в). Мы обнаружили, что $2,1 \pm 1,0\%$ ($n=9$) свежевыделенных НК-клеток здоровых доноров экспрессируют mbTGF-в (рис. 2). ФГА повышал процент mbTGF-в+ НК у здоровых доноров, по сравнению с нестимулированными клетками, тогда как в группе больных этого повышения не

наблюдалось (рис. 2). В сравнении с группой здоровых женщин, мононуклеары больных РМЖ, активированные ФГА, содержали больший процент mbTGF-в+ НК ($3,9 \pm 1,3$; $6,3 \pm 2,2$, соответственно, $p < 0,01$) (рис. 2). Мы не обнаружили статистически значимых различий в количестве НК-клеток, экспрессирующих iTGF-в и mbTGF-в, между возрастными группами и группами больных на различных стадиях РМЖ как до, так и после стимуляции.

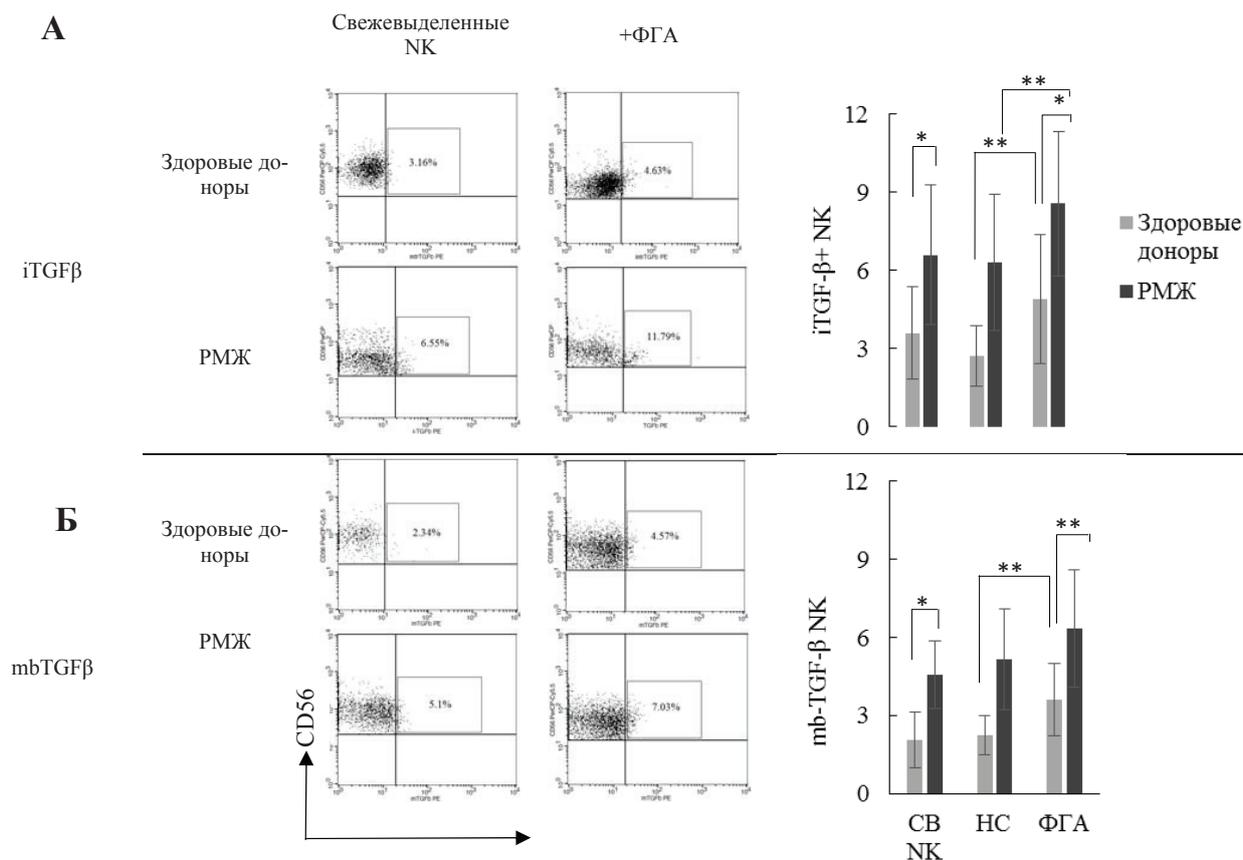


Рисунок 2 – Содержание iTGFβ⁺ (А) и mbTGFβ⁺ (Б) НК-клеток в свежевыделенных (СВ НК), нестимулированных (НС) и активированных ФГА мононуклеарах периферической крови здоровых доноров и больных раком молочной железы (РМЖ). Представлены репрезентативные результаты и обобщенные данные для каждой из исследованных групп. *Примечание:* данные представлены в виде средней и стандартного отклонения, достоверность отличий: * – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,05$

Таким образом, НК-клетки периферической крови больных РМЖ содержат повышенный процент IL-10- и TGF-в-экспрессирующих НК-клеток и НК-клеток, приобретающих данную способность при митогенной стимуляции. Полученные данные позволяют предположить, что при развитии РМЖ регуляторный пул НК-клеток увеличивается, что может снижать об-

щую цитолитическую активность НК [16]. Исходя из ингибирующего влияния данных цитокинов на противоопухолевый иммунитет [3], IL-10⁺ и TGF-в⁺ НК-клетки могут участвовать в создание супрессорного фона в опухолевом микроокружении и, тем самым, приводить к ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора.

Литература

- 1 Kozłowski L. et al. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients // *Rocz. Akad. Med. Białymst.* – 2003. – N 48. – P. 82-84.
- 2 Llanes-Fernandez L. et al. Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients // *Breast.* –2006. –V.15. –N.4. –P.482–489.
- 3 Hamidullah, Changkija B., Konwar R. Role of IL-10 in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2012.– V. 133.– N 1.– P. 11–21.
- 4 Moore K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor // *An. Rev. Immun.* –2001. – N19. – P. 683–765.
- 5 Mege J.L. et al. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases // *Lancet Infect. Diseases.* – 2006. – V.6. – N9. – P. 557–569.
- 6 Scott M.J. et al. Interleukin-10 suppresses natural killer cell but not natural killer T cell activation during bacterial infection // *Cytokine.* – 2006. – V. 33. – N2. –P. 79-86.
- 7 Crane C.A. et al. TGF- β downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8 T cells in glioma patients // *Neuro-Oncology.* – 2010. – V.12. – N1. –P.7–13.
- 8 Wilson E.B. et al. Human tumour immune evasion via TGF- β blocks NK cell activation but not survival allowing therapeutic restoration of anti-tumour activity // *PLoS ONE.* – 2011. – V.6. – N9. – P.10.
- 9 Poli A. et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset // *Immunology.* – 2009. – N126. – P.458–465.
- 10 Gray J.D. et al. Generation of an inhibitory circuit involving CD8 T cells, IL-2, and NK cell-derived TGF- β : contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3 // *J. Immunol.* – 1998. – N.160. – P.2248.
- 11 Deniz G. et al. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses // *J. Immunol.* – 2008. – N180. – P. 850 –857.
- 12 Giuliani M. et al. Generation of a novel regulatory NK cell subset from peripheral blood CD34+ progenitors promoted by membrane-bound IL-15 // *PLoS ONE.* – 2008. – V.3. – N 5. – P. 1 –16.
- 13 Higuma-Myojo S. et al. Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy // *AJRI.* – 2005. – N 54. – P.21–29.
- 14 Veenstra van Nieuwenhoven A.L. et al. Cytokine production in natural killer cells and lymphocytes in pregnant women compared with women in the follicular phase of the ovarian cycle // *Fertil. Steril.* – 2002. – N77. – P.1032–1037.
- 15 Gregg R.K. et al. A sudden decline in active membrane-bound TGF- β impairs both T regulatory cell function and protection against autoimmune diabetes // *J Immunol.* –2004. – V.173. – N12. – P.7308-7316.
- 16 Caras I. et al. Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients // *Cancer Immunol. Immunother.* –2004. –V.53. –N12. –P.1146 –52.