

**Жарков Н.В., Нуртазин С.Т., Жаркова И.М.**  
**ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ В КОЛОРЕКТАЛЬНЫХ КАРЦИНОМАХ**  
(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

*Изучена морфология и распределение опухолей ассоциированных макрофагов в колоректальных карциномах. Установлено, что макрофаги в ткани опухоли распределены неравномерно и отличаются морфологически. Наибольшая плотность макрофагальной инфильтрации отмечена в окружающей опухоль строме. В опухоли и пограничной слизистой различия в плотности макрофагальной инфильтрации статистически недостоверны ( $p=0,63$ ).*

Впервые воспалительные клетки в опухоли и по ее периферии были описаны в 1863 году Рудольфом Вирховым [1]. Известно, что воспалительные клетки, инфильтрирующие опухоли, представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из разных субпопуляций Т-лимфоцитов (хелперов, супрессоров и цитотоксических лимфоцитов), В-лимфоцитов, естественных киллеров и макрофагов [2]. Однако роль данной воспалительной инфильтрации при злокачественных новообразованиях до сих пор до конца не ясна. Изначально предполагалось, что воспалительные клетки, инфильтрирующие опухоль, проявляют исключительно противоопухолевое действие. Однако регрессия злокачественных опухолей под действием иммунной системы встречается крайне редко. И более того, известно, что иммунные клетки зачастую проявляют функции, способствующие опухолевой прогрессии [3, 4].

Основную часть воспалительных клеток, инфильтрирующих большинство опухолей и их метастазов, составляют ассоциированные с опухолью макрофаги [5, 6]. Причем действие опухолево-ассоциированных макрофагов может быть как противоопухолевое, так и стимулирующее прогрессию опухоли [7, 8]. Противоопухолевое действие макрофагов обычно связано как с действием синтезируемых литических ферментов, так и с непосредственным цитотоксическим действием на опухолевые клетки [9, 10]. Проопухолевое действие макрофагов заключается в стимуляции ангиогенеза и синтезе противовоспалительных цитокинов и простаноидов [11, 12]. Кроме того, макрофаги могут подавлять активность Т-лимфоцитов [13, 14] и естественных киллеров (NK-клеток) [15].

Количество макрофагов в различных опухолях может различаться в значительных пределах [2, 4, 16]. Степень и особенности макрофагальной инфильтрации метастатических поражений изучены меньше, однако установлено, что макрофаги также являются обязательным компонентом стромы вторичных поражений [16-19]. В метастазах уровень макрофагальной инфильтрации может в значительной степени меняться, поскольку опухолевые клетки в метастазах из-за накопления мутаций и другого клеточного микроокружения могут отличаться по способности привлекать моноциты [20].

Имеются отдельные публикации относительно изменения количества макрофагов на разных стадиях развития опухоли, но пока не удалось достоверно проследить в динамике изменения, происходящие как с макрофагами, так и со спектром сигнальных молекул, которые они синтезируют в процессе прогрессии опухоли [21, 22]. Экспериментально показано, что на численность макрофагов в опухоли, прежде всего, влияют сигнальные молекулы, синтезируемые именно опухолевыми клетками, а не Т-лимфоцитами или NK-клетками [17].

Цель исследования – изучить особенности морфологии и распределения опухолево-ассоциированных макрофагов в злокачественных новообразованиях толстой кишки.

#### **Материалы и методы**

Материалом для исследования послужил послеоперационный материал 79 больных раком толстой кишки. У большинства больных ( $n=71$ ) на момент операции была выставлена 3 стадия заболевания, у 5 больных была выставлена II стадия и у 3 больных - IV стадия заболевания.

Забор и фиксация материала в 10% растворе забуференного формалина проводились по стандартным гистологическим методикам. Затем после проводки материал заливался в парафин и из парафиновых блоков изготавливались серийные срезы толщиной 5 мкм для последующего гистологического и иммуногистохимического исследования. Для гистологического исследования препараты окрашивались гематоксилином и эозином. Для выявления опухолево-ассоциированных

макрофагов проводилось иммуногистохимическое исследование с коммерческими антителами к белку CD68 (панмакрофагальный маркер, клон PG-M1, титр разведения 1:100, производства Dako, Дания). В качестве хромогена использовался диаминобензидин.

Количество опухоль-ассоциированных макрофагов определялось непосредственно в опухоли толстой кишки, в прилегающей к опухоли строме и в пограничной слизистой.

Подсчет количества CD68-позитивных клеток (CD68+) выполнялся на 5 полях зрения при увеличении  $\times 400$ . Подсчет макрофагов проводился в автоматизированном режиме при помощи компьютерной системы анализа изображения «ВидеоТест – Мастер морфология» версии 4.0 (Санкт-Петербург, Россия). После подсчета количества CD68+ клеток на 5 полях зрения выводилось среднее количество макрофагов на 1 поле зрения.

Статистическая обработка проводилась в пакете для статистических исследований SPSS 16.0 (SPSS Inc., США) методами вариационной статистики. Достоверность различий определялась при помощи критерия Стьюдента. Результаты считались достоверными при  $p \leq 0,05$  (доверительный интервал 95%).

### Результаты и их обсуждение

Во время стандартного гистологического исследования материала на срезах окрашенных гематоксилином и эозином устанавливались гистологический тип и степень дифференцировки опухоли. Преобладающим гистологическим типом в исследованных образцах опухолей толстой кишки была аденокарцинома – 83,5% ( $n=66$ ). Слизистая аденокарцинома составила 13,9% ( $n=11$ ), мелкоклеточный рак – 1,3% ( $n=1$ ) и недифференцированный рак также 1,3% ( $n=1$ ).



Рисунок 1 - Распределение макрофагов в опухолях толстой кишки.

По степени дифференцировки изученные опухоли распределились следующим образом: высокая степень дифференцировки – 2,6% ( $n=2$ ), умеренная степень дифференцировки – 88,3% ( $n=70$ ), низкая степень дифференцировки – 7,8% ( $n=6$ ). В одном случае опухоль была недифференцированной (1,3%).

При изучении особенностей распределения макрофагальной инфильтрации в разных участках опухоли установлено, что наибольшее количество макрофагов (CD68+ клеток) отмечается в окружающей опухоль строме. Среднее количество макрофагов в перитуморальной строме было более чем в 1,5 раза больше чем количество макрофагов непосредственно в опухоли и в пограничной с опухолью слизистой. Различия статистически достоверны (в обоих случаях  $p < 0,001$ ). Количественные значения представлены на рисунке 1.

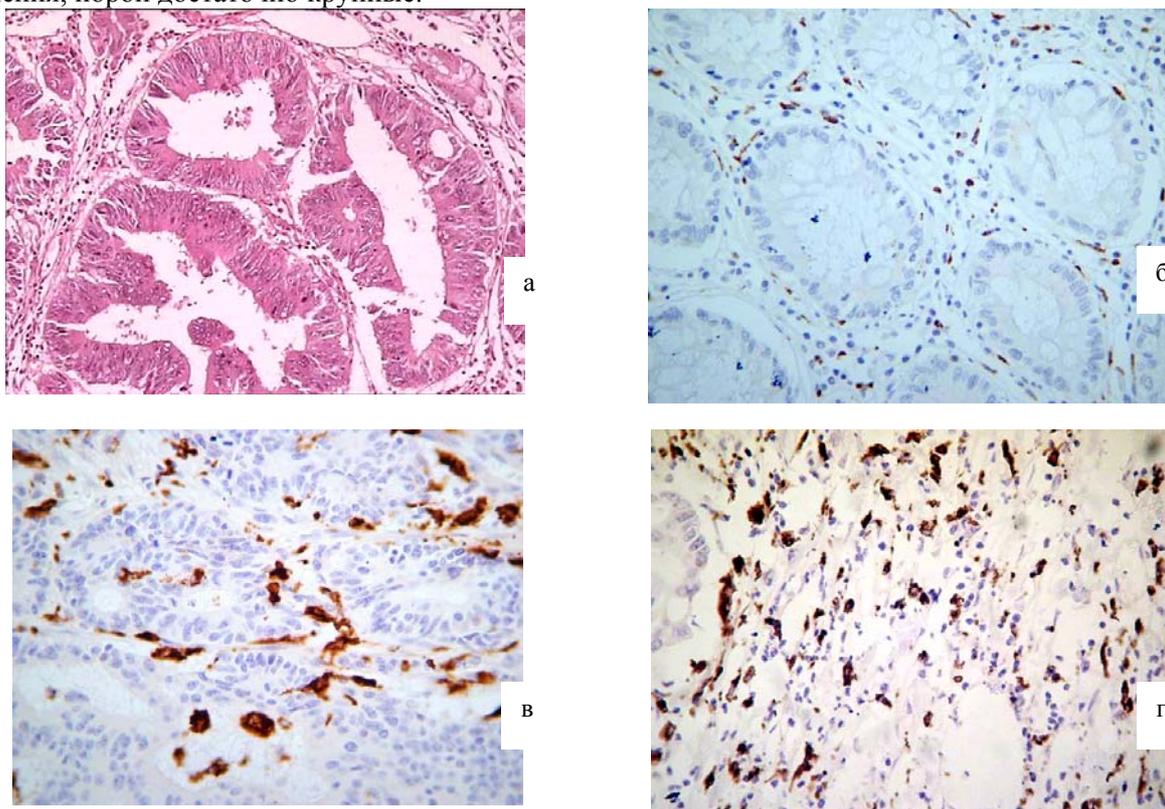
Макрофаги в разных участках опухоли различались и по своей морфологии. В пограничной слизистой рядом с разрастаниями опухолевой ткани (рисунок 2а) количество макрофагов было умеренное и представлены они в основном небольшими, вытянутыми клетками, расположенными в строме желез слизистой оболочки толстой кишки (рисунок 2б).

Непосредственно в опухоли количество макрофагов практически не изменяется в сравнении с пограничной слизистой ( $p=0,63$ ), но меняется морфология клеток. Инфильтрирующие опухоль макрофаги становятся больше размерами с достаточно крупным, округлой или овальной формы ядром. Располагаются макрофаги в опухоли, как непосредственно в опухолевой строме, так и в виде отдельных клеток, нередко, образуя скопления, в которых трудно дифференцировать отдельные макрофаги (рисунок 2в). Единичные макрофаги проникают непосредственно в атипичные железы.

В окружающей опухоль строме, как уже было указано выше, количество CD68+ клеток резко возрастает. Но по своей морфологии они больше напоминают макрофаги, локализованные в пограничной слизистой. Это мелкие клетки, в которых трудно четко дифференцировать ядро.

Расположены они преимущественно вокруг сосудистого русла, что позволяет предположить, что это макрофаги мигрировали в окружающую опухоль ткань из кровотока. Макрофаги, инфильтрирующие в окружающую опухоль строму, формируют своего рода воспалительный вал (рисунок 2г). По мере удаления от опухоли количество CD68+ клеток несколько снижается.

Установлено, что опухоль-ассоциированные макрофаги, инфильтрирующие колоректальные опухоли, локализованы неравномерно. Наибольшая плотность макрофагальной инфильтрации отмечается в окружающей опухоль строме. Это можно объяснить активной миграцией макрофагов из кровяного русла, возможно обусловленной как местной воспалительной реакцией, так и высоким уровнем хемоаттрактантов, синтезируемых опухолевыми клетками. В опухоли же количество макрофагов резко снижается, и они меняют свою морфологию. Увеличение размеров макрофагов может служить косвенным признаком их активации. Макрофаги в опухоли могут образовывать скопления, порой достаточно крупные.



а – умереннодифференцированная аденокарцинома толстой кишки, x400, окраска гематоксилином и эозином; б - CD68+ клетки в строме желез пограничной слизистой рядом с умереннодифференцированной аденокарциномой толстой кишки, x400, иммуногистохимическое окрашивание; в – CD68+ клетки, инфильтрирующие умереннодифференцированную аденокарциному толстой кишки, x400, иммуногистохимическое окрашивание; г – CD68+ клетки в строме, окружающей умереннодифференцированную аденокарциному толстой кишки, x400, иммуногистохимическое окрашивание.

### Рисунок 2 - Макрофаги, инфильтрирующие колоректальные опухоли:

Различия в количестве макрофагов внутри и по периферии опухоли, скорее всего, объясняется тем, что только часть привлеченных из кровотока макрофагов активируется, приобретает фенотип цитотоксических клеток и мигрирует непосредственно в опухоль. В активированном состоянии макрофаги могут проявлять функции, направленные на гибель опухолевых клеток (цитотоксичность, апоптоз) и/или осуществлять деструктивное действие путем нарушения микроциркуляторного русла опухоли [17].

В процессе взаимодействия макрофагов и опухолевых клеток опухоли способны ингибировать макрофагальную цитотоксичность как непосредственным действием, так и опосредованно, ингибируя активность Т-хелперов, которые в свою очередь активируют эффекторные противоопухолевые механизмы в макрофагах [23, 24]. Кроме того, что опухоли могут непосредственно снижать активность макрофагов, опухолевые клетки могут еще и модулировать синтез в макрофагах иммуностимулирующих цитокинов, например IL-18, который обуславливает иммунный ответ опосредованный лимфоцитами [25].

Таким образом, особенности распределения макрофагов и изменение их морфологии в ткани опухоли может свидетельствовать о важной роли, которую играют макрофаги, инфильтрирующие колоректальные карциномы. Роль макрофагов в опухолевой прогрессии и динамика изменения плотности макрофагальной инфильтрации на разных стадиях заболевания еще требует изучения. И широкий интерес, проявляемый к опухоли-ассоциированным макрофагам, в настоящее время, обусловлен не только изучением биологии злокачественных новообразований, но и потенциальной возможностью использования опухолевых макрофагов для модуляции роста опухоли и применения макрофагов для «целевой» доставки противоопухолевых лекарственных препаратов непосредственно в опухоль.

### **Литература**

- 1 Mantovani A. *Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines* // *Biology of Disease*, 1994. № 1. P. 5.
- 2 van Ravenswaay-Claasen H.H. et al. *Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity* // *Lab Invest*. 1992. Vol. 67. P. 166-174.
- 3 O'Sullivan C., Lewis C.E., Harris A.L., McGee J.O. *Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma* // *Lancet*, 1993. Vol. 342. P. 148-149.
- 4 Toomey D. et al. *Phenotyping of immune cell infiltrates in breast and colorectal tumours* // *Immunol Invest*, 1999. Vol. 28. P. 29-41.
- 5 Mantovani A., Ming W.J., Balotta C., Abdeljalil B., Bottazzi B. *Origin and regulation of tumor-associated macrophages: the role of tumor-derived chemotactic factor* // *Biochim Biophys Acta*, 1986. Vol. 865. P. 59-67.
- 6 Volodko N., Reiner A., Rudas M., Jakesz R. *Tumour-associated macrophages in breast cancer and their prognostic correlations* // *Breast*, 1998. №7. P. 99-105.
- 7 Mills C.D., Shearer J., Evans R., Caldwell M.D. *Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer* // *J Immunol*, 1992. Vol. 149. P. 2709-2714.
- 8 Elgert K.D., Alleva D.G., Mullins D.W. *Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection* // *J Leukoc Biol*, 1998. Vol. 64. P. 275-290.
- 9 Grabbe S. et al. *Interferon-gamma inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells* // *J Leukoc Biol*, 1994. Vol. 55. P. 695-701.
- 10 Blachere N.E. et al. *Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte response and tumor immunity* // *J Exp Med*, 1997. Vol. 186. P. 1315-1322.
- 11 Sunderkotter C. et al. *Macrophages and angiogenesis* // *J Leukoc Biol*, 1994. Vol. 55. P. 410-422.
- 12 Parajuli P., Singh S.M. *Alteration in IL-1 and arginase activity of tumor-associated macrophages: a role in the promotion of tumor growth* // *Cancer Lett*, 1996. Vol. 107. P. 249-256.
- 13 Alleva D.G., Burger C.J., Elgert K.D. *Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2* // *J Immunol*, 1994. Vol. 153. P. 1674-1686.
- 14 Aoe T., Saito T. *Towards immuno-modulation through the molecular mechanism of lymphocyte activation* // *Nippon Rinsho*, 1995. Vol. 53. P. 2331-2339.
- 15 Aso H. et al. *Impaired NK response of cancer patients to IFN-alpha but not to IL-2: correlation with serum immunosuppressive acidic protein (IAP) and role of suppressor macrophage* // *Microbiology & Immunology*, 1992. Vol. 36. P. 1087-1097.
- 16 Evans R. *Macrophages in syngeneic animal tumours* // *Transplantation*, 1972. Vol. 14. P. 468-73.
- 17 Mantovani A. et al. *The origin and function of tumor-associated macrophages* // *Immunol Today*, 1992. Vol. 13. P. 265-270.
- 18 O'Sullivan C., Lewis C.E. *Tumour-associated leucocytes: friends or foes in breast carcinoma* // *Journal of Pathology*, 1994. Vol. 172. P. 229-235.
- 19 Brunda M.J. et al. *Tumoricidal activity and cytokine secretion by tumor-infiltrating macrophages* // *Int J Cancer*, 1991. Vol. 48. P. 704-708.
- 20 Walter S. et al. *Macrophage infiltration and growth of sarcoma clones expressing different amounts of monocyte chemotactic protein JE* // *Int J Cancer*, 1991. Vol. 49. P. 431-435.
- 21 Pupa S.M. et al. *Macrophage infiltrate and prognosis in c-erbB-2-overexpressing breast carcinomas* // *J. Clin Oncol*, 1996. № 14(8). P. 2406-2407.
- 22 Seljelid R. *Tumour immunology: alternative perspectives* // *Scan J Immunol*, 1997. Vol. 46. P. 437-444.
- 23 Chouaib S. et al. *The host-tumor immune conflict: from immuno-suppression to resistance and destruction* // *Immunol Today*, 1997. Vol. 18. P. 493-497.

24 McCartney-Francis N.L., Wahl S.M. Transforming growth factor beta: a matter of life and death // *J Leukoc Biol*, 1994. Vol. 55. P. 401-409.

25 Micallef M.J. et.al. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production // *Eur J. Immunol*, 1996. Vol. 26. P. 1647-1651.

### **Тұжырым**

Тоқ ішектегі ісікпен байланысты макрофагтардың бөлінуі мен морфологиялары зерттелді. Ісіктің ішіндегі макрофагтардың бөлінуі біркелкі еместігі және олардың морфологиясының бір-бірінен өзгешелігі дәлелденді. Ісікті қоршаған стромада макрофагтың ең көп болатындығы көрсетілді. Ісік пен ісік жанындағы макрофаг саны статистика көрсеткіштері бойынша біркелкі ( $p=0,63$ ).

### **Summary**

It has been studied the morphology and distribution of a tumour-associated macrophages in colorectal carcinomas. It is established, that macrophages in a tumour tissue are distributed unevenly and have difference in morphology. The highest density of macrophagal infiltration is marked in stroma which located around a tumour. In a tumour and boundary mucous distinctions in density of macrophagal infiltration are statistically insignificant ( $p=0,63$ ).

**УДК 611.08:612.112.94:611.018.5:611.013.8**

**Смагулова Г.К., Толмачев В.С., Кудрина Н.О.**

## **ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ КРИОКОНЦЕРВАЦИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И СОХРАННОСТЬ РЕЦЕПТОРОВ CD 34, 45 НА МОНОУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПУПОВИННОЙ КРОВИ**

(Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии МЗ РК)

*Исследование посвящено анализу влияния низких температур на жизнеспособность гемопоэтических стволовых клеток для долгосрочного криоконсервирования. Определены наиболее благоприятные условия замораживания гемопоэтических стволовых клеток.*

Гемопоэтические стволовые клетки широко используется при лечении онкологических, гематологических, аутоиммунных и эндокринных заболеваний [1,2]. Источником гемопоэтических стволовых клеток служит как костный мозг, так и пуповинная кровь. Основной задачей при использовании гемопоэтических стволовых клеток является обеспечение жизнеспособности и сохранности стволовых клеток, как в количественном, так и в качественном отношении [3,4]. Наиболее ответственным этапом для сохранения жизнеспособности стволовых гемопоэтических клеток при их заготовке является этап замораживания. В настоящее время в мире существует несколько методик фракционирования и криоконсервирования пуповинной крови, однако не все позволяют получить качественный трансплантат после криохранения [4,5]. В связи с этим, проведено изучение эффективности методов замораживания мононуклеаров (МНК) при сочетании различных криопротекторных средств.

Цель исследования - изучить влияние криопротекторов на жизнеспособность и сохранность рецепторов CD 34, 45 на МНК и разработка температурного режима для долгосрочного криохранения МНК пуповинной крови.

### **Материалы и методы**

Изучили 60 образцов МНК из пуповинной крови, полученной в РГП «НЦА,ГиП» при физиологических родах. Мононуклеарную фракцию выделяли на градиенте фикола р-1,077 г/л. В качестве криопротектора использовали 10%, 5 % раствор диметилсульфоксида (ДМСО) в сочетании с раствором реополиглобина, а также 10% раствор глицерина в сочетании с 5% раствором глюкозы и аутоывороткой крови. Для охлаждения использовали равное соотношение криопротектора и клеток. Замораживали ступенчато- +4°C; -20°C; -70°C и переносили в жидкую фазу азота -196°C. Размораживали по схеме: -196°C; -70°C; -20°C; водяная баня + 40С. Для анализа CD 34, 45 в МНК использовали коммерческий набор CD34(Anti-НРСА-2)PE BD Biosciences (USA), CD45 FITS BD Biosciences(USA). Анализировали на проточном цитофлуориметре FacsCalibur с 488 nm аргоновым лазером, против контролей с использованием двухпараметрических гейтированных гистограмм.

### **Результаты и их обсуждение**

Каждый полученный образец суспензии анализировали на гематологическом анализаторе до