

*Н.П. Пупина¹, И.А. Балдуева¹, А.Б. Данилова¹, Н.А. Авдонкина¹, А.В. Новик^{1,2},
Т.Л. Нехаева¹, Г.И. Гафтон¹, Н.В. Емельянова¹*

Иммunosuppressивный потенциал периферических регуляторных Т-лимфоцитов в процессе опухолевой прогрессии у больных метастатическими саркомами мягких тканей

¹ ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,

² ГБОУ ВПО «СПбГПМУ» Минздрава России,
Санкт-Петербург

В опухолевом микроокружении создаются условия самоподдержания популяции Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) за счет продукции опухолевыми клетками сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF и хемокина CCL2. В представленной работе оценивали количественное содержание этих белков в супернатантах культивируемых клеток метастатических сарком мягких тканей (СМТ) и характеризовали иммунофенотип Treg периферической крови больных методом проточной цитометрии. В исследование включено 35 пациентов, получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н.Петрова. Для исследования были взяты образцы метастатических образований опухоли с целью получения культур опухолевых клеток и образцы периферической крови пациентов в период отсутствия роста опухоли (стабилизация заболевания — СЗ) или при прогрессировании заболевания (ПЗ). Выявлены статистически значимые различия у больных с ПЗ и СЗ в количественном содержании CCR10⁺Treg (9,1% и 4,5%, соответственно, $p=0,001$), CCR4⁺Treg (10% и 3,3%, соответственно, $p=0,001$), neuropilin-1 (Nrp1⁺) Treg (6% и 4,5%, соответственно, $p=0,021$). Обнаружена прямая корреляция высокой силы между продукцией клетками метастатических СМТ VEGF, CCL2 и экспрессией Treg Nrp1⁺ ($r=0,93$, $p=0,001$), VEGFR-2 ($r=0,88$, $p=0,007$), CCR4 ($r=0,81$, $p=0,024$). В группах больных липосаркомой ($n=11$) и синовиальной саркомой ($n=11$) установлены статистически значимые различия в содержании CCR10⁺Treg (9,5% и 2,93%, соответственно, $p=0,012$) и CCR4⁺Treg (68,3% и 3,95%, соответственно, $p=0,007$). Таким образом, у больных метастатическими СМТ наблюдается направленная миграция Treg в опухолевое микроокружение, обеспечивающее создание опухолеиндуцированной толерантности, которая может быть ассоциирована с ПЗ. Выявленные закономерности могут быть использованы для

планирования адъювантного и терапевтического лекарственного лечения больных СМТ.

Ключевые слова: метастатические саркомы мягких тканей, регуляторные Т-лимфоциты, иммуносупрессия, CCL2, CCR4, CCR10, Nrp1

Введение

Инфильтрация опухоли Т-регуляторными лимфоцитами (Treg) рассматривается как ключевой элемент иммуносупрессии прогрессирования злокачественного новообразования. Повышенное содержание этих клеток в периферической крови онкологических больных ассоциировано со многими опухолями [6]. Установлено, что соотношение количества опухолеассоциированных Treg и цитотоксических эффекторных Т-лимфоцитов может служить прогностическим фактором течения заболевания при ряде злокачественных новообразований, таких как рак яичника [15], рак легкого [24], меланома кожи [9, 22], глиобластома [21], рак молочной железы [3]. В настоящее время показано, что накопление Treg в опухоли происходит вследствие привлечения этих клеток в опухолевое микроокружение малигнизированными клетками и клетками врожденной иммунной системы, которые экспрессируют и секретируют лиганды хемокинов, рецепторы которых выявляются на поверхностной мембране Treg в комбинации с рецепторами тирозинкиназной активности VEGF.

Основными комбинациями хемокиновых рецепторов и их лигандов, взаимодействие которых может играть роль в реализации направленной миграции Treg, являются CCR4/CCL-2, -17, -22-, CCR5/CCL5, CCR10/CCL28, CXCR3/CXCL-9, -10, -11 [18]. Опухолевые клетки секретируют тирозинкиназный сигнальный белок VEGF, который связывается с рецептором VEGFR-2 и Nrp1 на поверхности Treg [4, 7, 25]. Исследования на животных моделях продемонстрировали ключевую роль VEGF в привлечении и накоплении Treg в опухолевой ткани. Так, на модели мышинной меланомы B16 было

показано, что блокада VEGF путем использования вирусного вектора, несущего ген VEGFR, приводила к уменьшению доли Treg в опухолевом микроокружении и увеличению эффективности противоопухолевой вакцинотерапии [16]. Была отмечена корреляция между экспрессией высоких уровней рецепторов VEGF в меланоме B16 и числом Treg в периферической крови экспериментальных животных. Терапевтические антитела против VEGF и лекарственный препарат сунитиниб снижали содержание Treg в экспериментальной модели опухоли толстой кишки CT26 [25]. Кроме того, в исследовании на модели спонтанной меланомы MT/tet показана зависимость Treg-индуцированного подавления противоопухолевых иммунных реакций в зависимости от степени выраженности экспрессии молекул Nrр1 на поверхности Treg [11].

Кроме того, использование модели меланомы MT/tet позволило установить факт экспрессии малигнизированными клетками хемокина CCL2, который связывается с рецептором CCR4 на Treg [13]. Индуцированная гипоксией продукция опухолевыми клетками хемокина CCL28 также может способствовать аккумуляции Treg в опухоли, как это было показано на модели рака яичников ID8, где поверхностный рецептор CCR10 Treg связывался с его лигандом CCL28 [10]. Клетки врожденной иммунной системы, NK-клетки, часто обнаруживаются в опухолевом микроокружении, секретируют CCL22 и способствуют направленной миграции Treg в опухолевый очаг [26].

Таким образом, можно полагать, что в опухоли создаются условия мобилизации Treg из периферической крови в опухолевое микроокружение за счет продукции опухолевыми клетками VEGF, CCL2, CCL28, молекул, которые индуцируют пролиферацию и направленную миграцию в опухолевый очаг Treg, экспрессирующих на своей поверхности рецепторы VEGFR-2, Nrр1, CCR4, CCR10 [23, 26].

Цель настоящей работы заключалась в оценке роли вышеописанных факторов в формировании опухоль-индуцированной иммуносупрессии для выявления закономерностей прогрессии опухоли при планировании лекарственного лечения больных СМТ.

Материалы и методы

В исследование были включены 35 больных СМТ, получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» с 2013 по 2017 г.г. Критерии включения: возраст старше 18 лет, гистологически верифицированный диагноз СМТ, отсутствие острых инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний в период обострения, свободный период от приема кортикостероидов или других иммуно-

депрессантов в течение последних 10 дней до включения в исследование. Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Были изучены образцы СМТ и образцы периферической крови пациентов. Исследовано 29 образцов периферической крови у больных с ПЗ и 16 образцов у больных со СЗ.

Клеточные культуры. Образцы опухолей пациентов подвергали механической дезагрегации, после чего полученную суспензию клеток пропускали последовательно через стерильные фильтры 100 и 70 мкм (BD Filcon, США) для получения моноклеточной суспензионной взвеси. Культивирование выделенных клеток производили в пластиковых флаконах с использованием питательной среды DMEM/F12 (Биолот, РФ), содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки, инсулин (5мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл), селен (5 нг/мл) (Invitrogen, США), антибиотика (пенициллин и стрептомицин в концентрации: 100 ед/мл и 100 мкг/мл соответственно) (Биолот, РФ) при 37°C, 5% CO₂, 100% влажности. При достижении моноклона производили пересев клеток с использованием равных объемов 0,25 %-ного раствора трипсина и 0,02 %-ного раствора версена.

Образцы периферической крови. Для исследования пулаций и субпулаций клеток иммунной системы производили забор 4 мл периферической крови до начала и в процессе лечения; образцы помещали в вакутейнеры, содержащие ЭДТА (BD, США).

Проточная цитометрия. Количественное содержание Treg CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low} исследовали в образцах периферической крови на приборе FACSCanto II (BD, США). На клеточной мембране Treg исследовали экспрессию хемокиновых рецепторов CCR4 (CD194), CCR10, Nrр1 (CD304), рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста-2 VEGFR-2 (CD309). Использовали реагенты BD Bioscience и Biolegend, США. При оценке количественного содержания Treg ориентировались на референсные значения, приведенные в руководстве Хайдукова С.В. и соавт. (2009) [2].

Имуноферментный анализ. В супернатантах культур СМТ, выделенных из образцов опухолей больных, включенных в исследование, определяли количественное содержание хемокина CCL10 и сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF. Определение проводили методом непрямого иммуноферментного анализа в «сэндвич»-варианте. Использовали наборы Bender MedSystems, Австрия и R&D, США. Контролем служили супернатанты культуры нормальных фибробластов кожи человека.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью систем статистической обработки IBMSPSS 19.0 и Microsoft Excel 2010. Для анализа использовали методы описательной статистики: данные представляли в виде медианы, интерквартильной широты (25-й и 75-й процентиля), минимума и максимума значений. Методы непараметрической статистики применяли для оценки различий между двумя независимыми выборками с использованием критериев Спирмена и Манна-Уитни, для многогруппового сравнения медиан — с использованием критериев Данна и Краскела-Уоллеса [1].

Результаты

Медиана распределения относительного содержания Treg в периферической крови больных метастатическими СМТ до лечения составила 6,7 (интерквартильная широта от 5,57 до 9,25).

Таблица 1. Характеристика больных СМТ, включенных в исследование

Характеристика	Количество пациентов (n=35)
Средний возраст, годы	48 (18-80)
Пол: мужчины женщины	9 (25,7%) 26 (74,3%)
Локализация первичного очага: конечность туловище внутренние органы	18 (51,43%) 7 (20%) 10 (28,57%)
Метастазы в легких: есть нет	17 (48,57%) 18 (51,43%)
Характеристика опухоли: лейомиосаркома липосаркома синовиальная саркома миксофибросаркома светлоклеточная саркома веретенноклеточная саркома внескелетная хондросаркома фибросаркома	5 (14,29%) 11 (31,43%) 11 (31,43%) 1 (2,86%) 2 (5,71%) 2 (5,71%) 2 (5,71%) 1 (2,86%)
Количество линий предшествующей терапии: Не получали системного лечения 1 2 3 и более	8 (22,8%) 5 (14,3%) 9 (25,7%) 13 (37,1%)

Таблица 2. Количественное содержание Treg в периферической крови больных СМТ и их иммунофенотип в зависимости от течения заболевания

Характер течения заболевания	Treg (%)				
	CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{low}	CCR10 ⁺	CD304 ⁺	VEGFR-2 ⁺	CCR4 ⁺
ПЗ, медиана интерквартильная широта	8,90 7,05-10,20	9,10 5,80-19,35	6,00 2,55 - 9,75	0,80 0,0 - 1,35	10,00 4,00 - 51,25
СЗ, медиана интерквартильная широта	8,75 6,80 - 9,37	4,50 2,60-6,20	2,50 1,80 - 4,40	0,20 0,00 - 1,30	3,30 1,95 - 4,50
p	0,776	0,001	0,021	0,435	0,001

ПЗ – прогрессирование заболевания
СЗ – стабилизация заболевания

Таблица 3. Распределение относительного содержания Treg у больных различными типами СМТ в зависимости от экспрессии рецепторов хемокинов и Nrp1

Параметры	Липосаркома	Синовиальная саркома	Лейомиосаркома
Treg (%)			
n	11	11	5
Медиана	9,5	7,4	5,8
25-75 процентиля	6,7 - 10,2	5,7 - 9,3	5,55 - 7,4
Min - Max	3,0 - 16,0	5,3 - 10,4	5,4 - 7,8
p	0,101		
CCR4+Treg (%)			
n	9	10	5
Медиана	68,3*	3,95*	6,0
25-75 процентиля	7,25 - 71,6	2,22 - 5,52	2,32 - 9,6
Min - Max	3,4 - 75,7	0,7 - 11,1	1,9 - 10,0
p	0,012		
CCR10+Treg (%)			
n	11	11	5
Медиана	9,5**	2,93**	8,2
25-75 процентиля	5,1 - 14,9	2,4 - 5,9	7,0 - 9,3
Min - Max	2,08 - 20,0	1,3 - 9,1	6,1 - 9,7
p	0,006		
Nrp1+Treg (%)			
n	9	11	5
Медиана	4,5	4,2	6,7
25-75 процентиля	3,05 - 9,05	3,1 - 7,1	2,8 - 19,1
Min - Max	2,1 - 11,4	1,8 - 17,5	2,7 - 30,1
p	0,814		

*апостериорный тест - p=0,012
** апостериорный тест - p=0,007

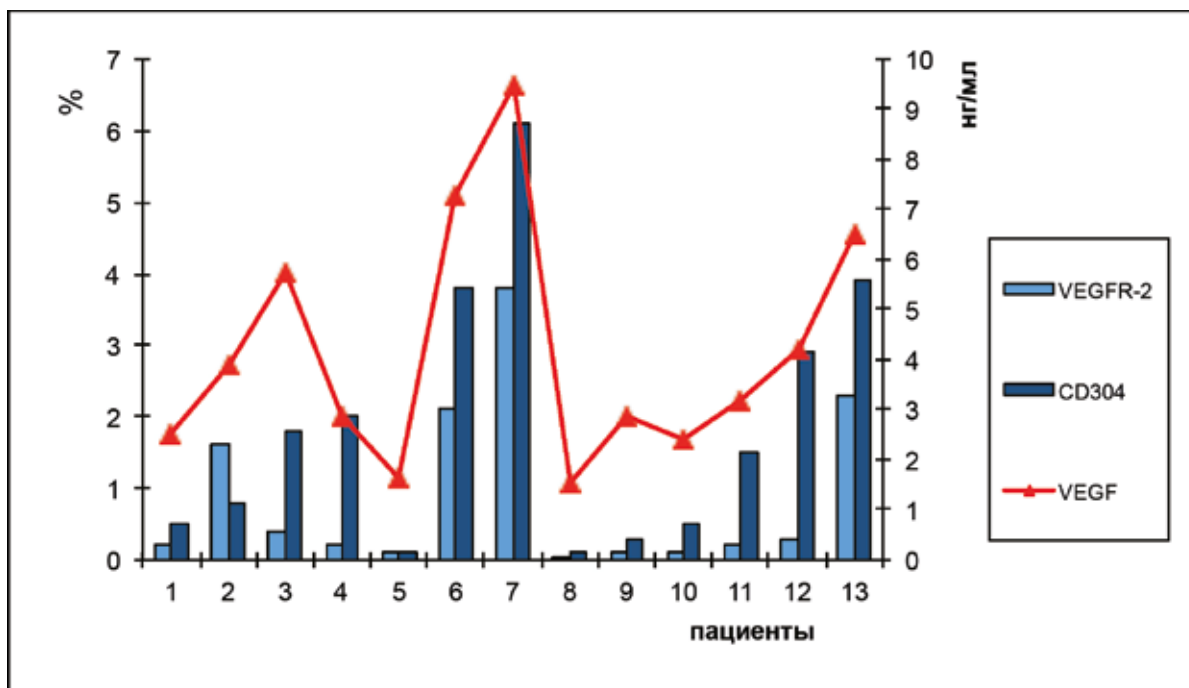


Рис. 1. Графическое изображение зависимости продукции клетками CMT VEGF и экспрессии на Treg Nrp1⁺ (CD304) и рецептора VEGFR-2 (CD309)

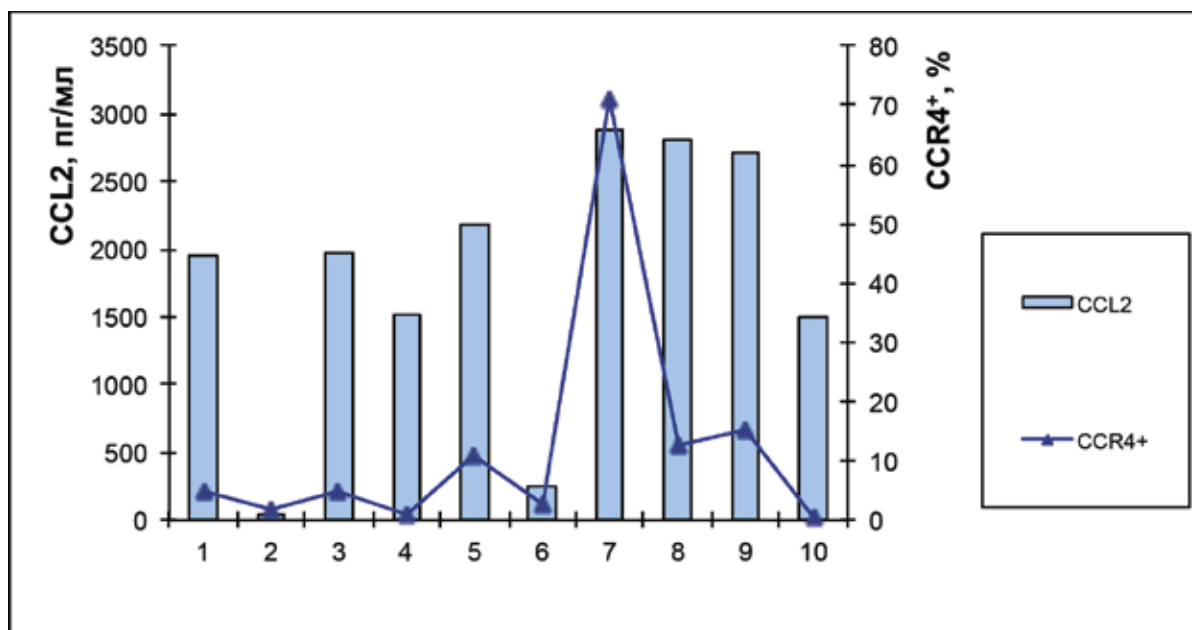


Рис. 2. Графическое изображение зависимости продукции клетками CMT хемокина CCL2 и экспрессии на Treg хемокинового рецептора CCR4 (CD194)

Минимальное и максимальное значение этого параметра в данной группе пациентов составило 4,5 — 10,2%, что перекрывает границы референсных значений (1,65–5,75%). Сопоставление относительного количества Treg у больных с ПЗ и СЗ указывает на тенденцию к увеличению субпопуляции Treg в периферической крови у пациентов с ПЗ (табл. 2).

При статистическом анализе зависимости изучаемых показателей Treg от течения заболевания выявили статистически значимые различия

у больных с ПЗ и СЗ в количественном содержании Treg, экспрессирующих на своей поверхности CCR10 ($p=0,001$), CCR4 ($p=0,001$), Nrp1 ($p=0,021$). У одного больного хондросаркомой относительное содержание CCR10+Treg составило 98,9% за 3 мес. до клинического проявления метастазирования опухоли в головной мозг, в то время, когда экспрессия CCR4 не превышала 10%.

При многогрупповом сравнении относительных значений общего содержания Treg и суб-

популяций Treg, экспрессирующих изучаемые рецепторы, у больных СМТ разных гистологических типов были выявлены значимые различия ($p=0,012$ и $p=0,006$) для CCR4+Treg и CCR10+Treg. Для уточнения категорий значимости применили апостериорный тест Данна для попарного сравнения групп пациентов, который показал значимые различия только для когорт с липосаркомой и синовиальной саркомой ($p=0,012$ и $p=0,007$) (табл. 3).

Измерение количества VEGF и хемокина CCL2 в супернатантах клеточных культур СМТ позволило установить, что культивируемые опухолевые клетки, независимо от их гистотипической принадлежности, продуцируют значительные количества этих факторов. Наибольшее количество VEGF продуцировали клетки лейомиосарком и миксофибросарком. Максимальное содержание VEGF в клеточных супернатантах СМТ составило 9,49 нг/мл, минимальное — 1,54 нг/мл в сравнении с содержанием VEGF в контрольных супернатантах культуры нормальных фибробластов кожи человека 0,14 нг/мл. СМТ демонстрировали большую вариабельность в продукции CCL2, наиболее активными продуцентами были липосаркомы, хондросаркомы и лейомиосаркомы. Максимальное содержание CCL2 составило 2895,0 пг/мл, минимальное — 44,02 пг/мл.

Была обнаружена прямая корреляция высокой силы между продукцией клетками СМТ VEGF и экспрессией на Treg Nrp1+ ($r=0,93$, $p=0,001$) и VEGFR-2+ ($r=0,88$, $p=0,007$) (рис.1).

Изучение системы CCR4/CCL2 также показало наличие прямой корреляции высокой силы ($r=0,81$, $p=0,024$) (рис.2).

Обсуждение

Как известно, Treg играют центральную роль в обеспечении аутоотолерантности и поддержании иммунологического гомеостаза. При злокачественных новообразованиях их функционирование может способствовать опухолевой прогрессии, так как они оказывают супрессивное воздействие на противоопухолевые иммунные реакции [24, 26, 27]. В нашем исследовании было обнаружено, что у больных СМТ до лечения наблюдается повышенное содержание Treg в периферической крови по сравнению с референсными значениями, предлагаемыми В.С. Хайдуковым и соавт. (2009) (min-max 4,5 — 10,2% и 1,65–5,75% соответственно) [2]. При прогрессировании заболевания наблюдали тенденцию к увеличению этого показателя: распределение относительного содержания Treg в крови пациентов с ПЗ имело медиану 8,9% с интерквартильной

широтой 7,05 — 10,20%, тогда как у больных при СЗ медиана составила 8,75% (интерквартильная широта 6,80–9,37%).

Опухолевые клетки синтезируют целый спектр факторов, способствующих развитию индуцированной иммуносупрессии: в опухолевом микроокружении повышается концентрация хемоаттрактантов и ростовых факторов, создающих направленную миграцию к опухоли клеточных элементов иммунной системы [25]. Нами проведено сравнительное изучение продукции культивируемыми клетками СМТ хемокина CCL2, фактора VEGF и экспрессии на Treg периферической крови у этих же больных рецепторов, специфичных к данным молекулам. Мы исходили из предположения, что Treg, находящиеся в кровотоке, уже должны обладать необходимым рецепторным аппаратом, на который могут воздействовать опухолевые клетки, формируя направленную миграцию. В результате было обнаружено наличие прямой корреляции высокой силы при анализе систем взаимодействия CCR4/CCL2, VEGFR-2/VEGF, Nrp1+ /VEGF. Были выявлены статистически значимые различия в процентном содержании Treg, экспрессирующих на своей поверхности CCR10 ($p=0,001$), CCR4 ($p=0,001$) и Nrp1+ ($p=0,021$) между группами больных с ПЗ и СЗ. Интересно, что в работе A. Overacre и соавт. (2014) была выдвинута идея о роли Nrp1 в стабилизации иммуносупрессивных свойств Treg как одном из механизмов поддержания опухолевого роста [19]. Показано, что выраженность экспрессии Nrp1 на Treg ассоциирована с их иммуносупрессивной активностью, но механизм этого феномена пока еще не совсем ясен [6]. Тем не менее, в настоящее время ряд исследователей рассматривает Nrp1 как маркер активации Treg и связывает уменьшение этого показателя в процессе химиотерапии с положительным эффектом лечения.

В исследовании L. Chen et al. (2014) была показана значимость CCR10 в пролиферации и инвазии злокачественных клеток глиобластомы [8]. В нашем исследовании относительное содержание CCR10+Treg увеличивалось при ПЗ, медиана распределения этого показателя составила 9,1% (интерквартильная широта 5,8–19,35%) по сравнению с 4,5% (интерквартильная широта 2,6–6,2, $p=0,001$) при СЗ. Таким образом, можно предполагать, что увеличение экспрессии CCR10 на Treg у больных СМТ ассоциировано с диссеминацией опухолеинфильтрирующих CCR4+Treg обнаруживается при лимфоме Ходжкина, метастатическом раке легкого и молочной железы, раке предстательной железы [5]. В экспериментальных

исследованиях *in vitro* лимфомы Ходжкина блокада CCR4 моноклональными антителами, специфическими к этому рецептору, значительно подавляла миграцию Treg в опухоль [12]. Мы выявили статистически значимое ($p=0,001$) увеличение количества CCR4+Treg в периферической крови больных СМТ при прогрессировании заболевания: 10% (4,0–51,25%) в сравнении с 3,3% (1,95–4,5%) у пациентов со СЗ. Однако не было обнаружено значимых различий в экспрессии рецептора VEGFR-2 у больных с ПЗ и СЗ, в то время как наблюдалась корреляция между присутствием VEGFR-2 на поверхности Treg и продукцией VEGF опухолевыми клетками пациентов СМТ. Можно выдвинуть гипотезу, что злокачественные клетки используют несколько альтернативных механизмов привлечения Treg, и при СМТ система взаимодействия Nrp1/VEGF является преобладающей для формирования их направленной миграции.

Интересно, что существуют явные количественные различия субпопуляций Treg при разных нозологических формах СМТ. Использование непараметрического критерия Краскела-Уоллиса и критерия Данна для множественного сравнения выборок позволило установить наличие статистически значимых различий в содержании CCR4+Treg и CCR10+Treg между группами больных липосаркомой и синовиальной саркомой. В случае липосаркомы экспрессия этих хемокиновых рецепторов была значительно более выражена. Можно предположить, что липосаркомы, и, в меньшей степени, лейомиосаркомы являются более иммунозависимыми. Мы зарегистрировали положительный клинический ответ на иммунотерапию аутологичными дендритными клетками у пациентов с липосаркомой, в том числе частичный регресс брюшинной опухоли у одной больной. При этом в периферической крови пациентов происходило снижение количества Treg с экспрессией поверхностных рецепторов CCR4, CCR10 и Nrp1 в процессе лечения и повышение их уровня перед прогрессированием заболевания.

Нами было установлено, что клетки метастатических СМТ способны продуцировать высокие уровни хемокина CCL2, количество которого находится в прямой зависимости высокой силы от содержания в периферической крови больных CCR4+Treg. По данным литературы продукция CCL2 клетками опухоли носит неоднозначный характер, так как этот хемокин способен привлекать различные клетки иммунной системы: Treg, супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), моноциты, макрофаги, что было отмечено для колоректального рака, рака эндометрия, мета-

статического рака молочной железы [14, 20]. В частности, установлено для глиомы, что злокачественные клетки синтезируют CCL2, который рекрутирует CCR4+Treg и Ly-6C+ MDSC, создает условия локальной иммуносупрессии, способствует дальнейшей прогрессии опухоли [5]. В то же время, опубликованы данные об увеличении общей выживаемости пациентов с глиомой и раком поджелудочной железы, которая ассоциирована с повышенной продукцией CCL2 опухолевыми клетками и привлечением в опухоль моноцитарных клеток и макрофагов с провоспалительным иммунофенотипом [5, 17].

Таким образом, у больных метастатическими СМТ обнаружена система направленной миграции Treg в опухолевое микроокружение, обеспечивающая создание опухолеиндуцированной толерантности, которая ассоциирована с ПЗ. Выявленные закономерности могут быть использованы для планирования дальнейших экспериментальных исследований, в том числе адъювантной и/или паллиативной иммунотерапии у некоторых категорий больных СМТ.

Выводы

1. У больных метастатическими СМТ при ПЗ статистически значимо увеличивается количественное содержание CCR10+Treg ($p=0,001$), CCR4+Treg ($p=0,001$), Nrp1+Treg ($p=0,021$).
2. В группах больных липосаркомой ($n=11$) и синовиальной саркомой ($n=11$) установлены статистически значимые различия в содержании CCR10+Treg (9,5% и 2,93%, соответственно, $p=0,012$) и CCR4+Treg (68,3% и 3,95%, соответственно, $p=0,007$).
3. Выявлена прямая корреляция высокой силы между продукцией клетками метастатических СМТ VEGF, CCL2 и экспрессией на Treg Nrp1 ($r=0,93$, $p=0,001$), VEGFR-2 ($r=0,88$, $p=0,007$), CCR4 ($r=0,81$, $p=0,024$).
4. Выявленные закономерности могут быть использованы для планирования дальнейших экспериментальных исследований, в том числе адъювантной и/или паллиативной иммунотерапии у некоторых категорий больных СМТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т.А. Ланг, М. Сесик; пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. — М.: Практическая медицина, 2011. — 480 с.
2. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян А.А. и др. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом проточного цитометрического анализа) // Медицин-

- ская иммунология. — 2009. — Т. 11. — № 2-3. — С. 227-238.
3. Bohling S.D., Allison K.H. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target // *Mod Pathol.* — 2008. — Vol. 21(12). — P. 1527-1532.
 4. Bruder D., Probst-Kepper M., Westendorf A.M. et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells // *Eur. J. Immunol.* — 2004. — Vol. 34(3). — P. 623-630.
 5. Chang A.L., Miska J., Wainwright D.A. et al. CCL2 Produced by the Glioma Microenvironment Is Essential for the Recruitment of Regulatory T Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells // *Cancer Res.* — 2016. — Vol. 76(19). — P. 5671-5682. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0144.
 6. Chaudhary B., Elkord E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting // *Vaccines (Basel).* — 2016. — Vol. 4(3). — P. pii E28-53.
 7. Chaudhary B., Khaled Y.S., Ammori B.J., Elkord E. Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2014. — Vol. 63(2). — P. 81-99.
 8. Chen L., Liu X., Zhang H.-Y. et al. Upregulation of chemokine receptor CCR10 is essential for glioma proliferation, invasion and patient survival // *Oncotarget.* — 2014. — Vol. 5(16). — P. 6576-6583.
 9. DeLeeuw R.J., Kost S.E., Kakal J.A., Nelson B.H. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: A critical review of the literature // *Clin. Cancer Res.* — 2012. — Vol. 18. — P. 3022-3029.
 10. Facciabene A., Peng X., Hagemann I.S. et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells // *Nature.* — 2011. — Vol. 475(7355). — P. 226-230.
 11. Hansen W., Hutzler M., Abel S. et al. Neuropilin 1 deficiency on CD4+ Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth // *J. Exp. Med.* — 2012. — Vol. 209(11). — P. 2001-2016.
 12. Ishida T., Ishii T., Inagaki A. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege // *Cancer Res.* — 2006. — Vol. 66(11). — P. 5716-5722.
 13. Kimpfler S., Sevko A., Ring S. et al. Skin melanoma development in ret transgenic mice despite the depletion of CD25+Foxp3+regulatory T cells in lymphoid organs // *J. Immunol.* — 2009. — Vol. 183(10). — P. 6330-6337.
 14. Kitamura, Qian B.Z., Soong D. et al. CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages // *J. Exp. Med.* — 2015. — Vol. 212. — P. 1043-1059.
 15. Leffers N., Gooden M.J., de Jong R.A. et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2009. — Vol. 58. — P. 449-459.
 16. Li B., Lalani A.S., Harding T.C. et al. Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy // *Clin Cancer Res.* — 2006. — Vol. 12(22). — P. 6808-6816.
 17. Long K.B., Gladney W.L., Tooker G.M. et al. IFN γ and CCL2 Cooperate to Redirect Tumor-Infiltrating Monocytes to Degrade Fibrosis and Enhance Chemotherapy Efficacy in Pancreatic Carcinoma // *Cancer Discov.* — 2016. — Vol. 6. — P. 400-403.
 18. Ondondo B., Jones E., Godkin A., Gallimore A. Home sweet home: The tumor microenvironment as a haven for regulatory T cells // *Front. Immunol.* — 2013. — Vol. 16(4). — Article:197. — 9 p.
 19. Overacre A., Delgoffe G., Vignali D. Neuropilin-1 enforces Treg stability and function in the tumor microenvironment // *J. Immunol.* — 2014. — Vol. 192 (1 Supplement). — P. 71.13.
 20. Pena C.G., Nakada Y., Saatcioglu H.D. et al. LKB1 loss promotes endometrial cancer progression via CCL2-dependent macrophage recruitment // *J. Clin. Invest.* — 2015. — Vol. 125. — P. 4063-4076.
 21. Sayour E.J., McLendon P., McLendon R. et al. Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2015. — Vol. 64. — P. 419-427.
 22. Shang B., Liu Y., Jiang S.J., Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: A systematic review and meta-analysis // *Sci. Rep.* — 2015. — Vol. 14 (5). — P. 15179.
 23. Takeuchi Y., Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity // *Int. Immunol.* — 2016. — Vol. 28(8). — P. 401-409.
 24. Tao H., Mimura Y., Aoe K. et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells // *Lung Cancer.* — 2012. — Vol. 75. — P. 95-101.
 25. Terme M., Pernot S., Marcheteau E. et al. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer // *Cancer Res.* — 2013. — Vol. 73(2). — P. 539-549.
 26. Turk M.J. Regulatory T cells and cancer / In: Gabrilovich D.I., Hurlwitz A.A., editors. *Tumor-induced immune suppression. Mechanisms and therapeutic reversal.* — New York: Springer; 2014. — p. 1-37.
 27. Ward-Hartstonge K.A., Kemp R.A. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response // *Clin. Translational. Immunol.* — 2017. — Vol. 6. — P. e154.

Поступила в редакцию 15.02.2018 г.

N.P. Pipia¹, I.A. Baldueva¹, A.B. Danilova¹, N.A. Avdonkina¹, A.V. Novik^{1,2}, T.L. Nekhaeva¹, G.I. Gafton¹, N.V. Emelyanova¹

Immunosuppressive potential of peripheral regulatory T-lymphocytes in the process of tumor progression in patients with metastatic soft tissue sarcomas

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology

²St. Petersburg State Pediatric Medical University
St. Petersburg

In tumor microenvironment the self-maintenance condition of T-regulatory lymphocytes (Treg) are created by tumor cells due to the production of vascular endothelial growth factor VEGF and chemokine CCL2. In the present work there was evaluated the quantitative content of these proteins in cultured cell supernatants of metastatic soft tissue sarcomas (STS) as well as characterized the immunophenotype of peripheral blood Treg by flow cytometry. The study included 35 patients who received treatment at the N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology. For the study— samples of metastatic tumor were taken to obtain sarcoma cell culture and samples of peripheral blood of patients in the absence of tumor growth (stable disease-SD) or disease progression (PD). The statistically significant differences were found in the quantitative content of CCR10⁺Treg (9.1% and 4.5%, respectively, p=0.001), CCR4⁺Treg (10% and 3.3%, respectively, p=0.001), neuropilin-1 (Nrp1⁺) Treg (6% and 4.5%, respectively, p=0.021) in patients with PD and SD. A direct correlation of high strength was found between production of VEGF, CCL2 by metastatic STS cells and expression of Nrp1 (r=0.93, p=0.001), VEGFR-2 (r=0.88, p=0.007), CCR4 (r=0.81, p=0.024) by Treg cells. Statistically significant differences in the CCR10⁺Treg (9.5% and 2.93%, respectively, p=0.012) and CCR4⁺Treg (68, 3% and 3.95%, respectively, p=0.007) were detected in the group of patients with liposarcoma and synovial sarcoma. Thus in patients with metastatic STS — there was directional chemotaxis of Treg into tumor microenvironment providing the creation of tumor-induced tolerance, which could be associated with DP. The revealed regularities could be used to plan adjuvant and palliative treatment of STS patients.

Key words: metastatic soft tissue sarcomas, regulatory T-lymphocytes, immunosuppression, CCL2, CCR4, CCR10, Nrp1