

## **VEGF-АССОЦИИРОВАННЫЕ ФАКТОРЫ И Т-РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ В КОНТЕКСТЕ ПРОБЛЕМЫ НЕОАНГИОГЕНЕЗА ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ 0-IA СТАДИЙ**

**Курмышкина Ольга Вадимовна, Белова Любава Леонидовна, Ковчур Павел Иванович, Волкова Татьяна Олеговна**

ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

Курмышкина О.В.

185910 Россия, Республика Карелия, Петрозаводск, пр. Ленина, 33

E-mail: [studioza@mail.ru](mailto:studioza@mail.ru)

**Аннотация.** Изучение молекулярных факторов и механизмов, контролирующих процессы лимфангиогенеза, инвазии и метастазирования при раке шейки матки, составляют наиболее актуальную проблему молекулярной онкогинекологии. Лимфангиогенез-стимулирующие сигналы могут исходить как от опухолевых клеток, так и от специфических популяций клеток иммунной системы. В связи с этим, **цель** данной работы заключалась в исследовании изменений уровня экспрессии генов VEGF-C, VEGF-R3, PlGF, ETS1 в образцах пре- и микроинвазивного РШМ, в сравнении с нормальным эпителием, а также в определении отклонений в численности регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs) и уровня TGF $\beta$ 1 крови в указанных группах больных относительно группы здоровых доноров.

**Материалы и методы.** Биоматериал (образцы ткани и периферической крови) был получен от пациенток Республиканского онкологического диспансера (г. Петрозаводск). Анализ уровня экспрессии генов проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Иммунофенотипирование Tregs проводилось методом проточной цитофлуориметрии. Содержание TGF $\beta$ 1 в плазме крови оценивалось методом иммуноферментного анализа.

**Результаты.** 1. Установлено, что экспрессия генов VEGF-C, VEGF-R3, PlGF и ETS1 существенно увеличена в клетках РШМ, по сравнению с нормальным цервикальным эпителием, однако, общий профиль активности данных генов индивидуален для каждой пациентки. Полученный результат указывает на очень раннее формирование лимфангиогенного профиля РШМ – на этапе преинвазивного роста. 2. Была проанализирована численность Tregs периферической крови, описываемых фенотипом CD4(+)CD25(+/high)CD127(dim/neg)FoxP3(+). В группе больных РШМ 0-IA стадии обнаружено увеличение количества Tregs, в сравнении с группой здоровых доноров, сопровождающееся достоверным повышением уровня TGF $\beta$ 1.

**Заключение.** У больных РШМ на самых ранних этапах наблюдаются скоординированные изменения исследованных показателей, как на локальном, так и на системном уровнях, направленные на стимуляцию лимфангиогенеза и формирующие основу для инвазии и раннего метастазирования клеток опухоли.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, неоангиогенез, сосудистые факторы роста, регуляторные Т-лимфоциты, трансформирующий фактор роста, экспрессия генов.

## VEGF-ASSOCIATED FACTORS AND REGULATORY T-CELLS IN THE CONTEXT OF NEOANGIOGENESIS IN CERVICAL CANCER OF 0-IA STAGES

Olga V. Kurmyshkina, Lubava L. Belova, Pavel I. Kovchur, Tatyana O. Volkova

Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

O.V. Kurmyshkina

33 Lenin str., Petrozavodsk, Russia 185910

E-mail: [studioza@mail.ru](mailto:studioza@mail.ru)

**Abstract.** Investigation of molecular factors and mechanisms, controlling the processes of lymphangiogenesis, invasion and metastasis in cervical cancer, represents one of the most urgent tasks of molecular oncogynecology. Lymphangiogenesis-promoting signals may come from either tumor cells or specific subpopulations of immune cells. In this connection, our **aim** was to explore the changes of expression levels of VEGF-C, VEGF-R3, PlGF, and ETS1 genes in samples of pre- and microinvasive squamous cervical cancer, compared to normal epithelium of the cervix, and to determine deviations in regulatory T-cells (Tregs) counts and TGF $\beta$ 1 plasma level in cervical cancer patients relative to the control group of healthy donors.

**Methods.** Tissues biopsies and peripheral blood samples were obtained from patients of the Republic Oncological Dispensary. Real-time PCR was used to analyze gene expression. Immunophenotyping of blood lymphocytes was done by means of multi-color flow cytometry. The level of TGF $\beta$ 1 was assessed by ELISA.

**Results.** 1. Significant increase of VEGF-C, VEGF-R3, PlGF, and ETS1 gene expression in cervical cancer samples, as compared to normal epithelium, was found, however, the total profile of activity of these genes was shown to be specific for each case. These results indicate very early establishment of lymphangiogenic microenvironment in cervical cancer locus – at the stage of preinvasive growth. 2. The number of circulating Tregs described by phenotype CD4(+)CD25(+/high)CD127(dim/neg)FoxP3(+) was analyzed. Elevated counts of Tregs were revealed in women with stage 0-IA cervical cancer, compared to healthy controls; increase of Treg numbers was accompanied by significant elevation of TGF $\beta$ 1 concentration in plasma.

**Conclusion.** Cervical cancer patients at initial stages of tumor progression demonstrate coordinated changes of the parameters chosen for our study, both at local and systemic level; these changes are likely to drive stimulation of lymphangiogenesis and to form environment for tumor cell invasion and early metastasis.

**Keywords:** cervical cancer, neoangiogenesis, vascular endothelial growth factors, regulatory T-cells, transforming growth factor, gene expression.

## Введение

Цервикальные интраэпителиальные неоплазии (ЦИН) и рак шейки матки (РШМ) составляют одну из наиболее актуальных проблем репродуктивной медицины. Несмотря на значительный успех в сфере ранней диагностики и профилактики ВПЧ-инфекции и ЦИН, уровень заболеваемости инвазивным РШМ среди женщин молодого/среднего репродуктивного возраста и смертности от данной онкопатологии остается по-прежнему высоким, что свидетельствует о наличии ряда неразрешенных фундаментальных вопросов, касающихся механизмов формирования злокачественного потенциала клеток РШМ *in vivo*. РШМ представляет собой один из наиболее агрессивных типов рака, характеризующихся ранним формированием опухолевой микрососудистой сети, которая способствует быстрой прогрессии и раннему метастазированию. Согласно современным представлениям, как процессы ангиогенеза, так и процессы лимфангиогенеза и их молекулярные регуляторы имеют сопоставимо важное значение для прогрессии РШМ на ранних стадиях, однако, информации об экспрессии данных регуляторов на этапе пре- и микроинвазивного РШМ (стадия 0-IA) недостаточно (Курмышкина, 2015). Особый интерес представляют члены VEGF-семейства (*vascular endothelial growth factor*), контролирующие развитие лимфатических/кровеносных микрокапилляров, эпителиально-мезенхимного превращения и клеточной миграции – VEGF-C фактор, его рецептор VEGF-R3 и PlGF (*placenta growth factor*) (Van Trappen, 2003; Dewerchin, 2012), а также специфические проангиогенные транскрипционные факторы, как например, представители ETS-семейства (*E26 transformation-specific*) (Randi, 2009). Не менее важным и сравнительно малоизученным аспектом проблемы РШМ-ассоциированного неоангиогенеза является вклад иммунного компонента, в частности регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs), для которых, помимо иммуносупрессорной, также описана лимфангиогенез-стимулирующая активность (James, 2013). Связующим звеном между Tregs и VEGF-C-зависимыми процессами неоангиогенеза является трансформирующий фактор роста TGF $\beta$  – ключевой цитокин, секретируемый Tregs и стимулирующий VEGF-опосредованный сигналинг (Facciabene, 2012).

**Целью** работы являлось исследование изменений уровня экспрессии генов VEGF-C, VEGF-R3, PlGF, ETS1 в образцах пре- и микроинвазивного РШМ, в сравнении с нормальным эпителием, а также определение отклонений в численности субпопуляции циркулирующих CD4-Tregs и уровня TGF $\beta$  плазмы крови в указанных группах больных относительно группы здоровых доноров.

## Материалы и методы

Биоматериал был получен от пациенток ГБУЗ Республиканский онкологический диспансер, давших добровольное согласие на участие в исследовании. Образцы патологического эпителия были получены в ходе операции конизации от 10 пациенток с плоскоклеточной карциномой *in situ* (РШМ 0 стадии) и 5 пациенток с микроинвазивным РШМ (РШМ IA стадии). В каждом случае, первоначальный диагноз был верифицирован методом гистологического анализа. Позитивный ВПЧ-статус был подтвержден с помощью ПЦР-диагностики. Также фрагменты нормального цервикального эпителия были получены в условиях женской консультации от 5 женщин с негативным ВПЧ-статусом. Тотальная РНК была выделена из биоматериала с помощью реагента TriZOL («Invitrogen», США) и переведена в кДНК с использованием набора для обратной транскрипции ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis kit («New England BioLabs», Великобритания). Анализ уровня экспрессии генов проводили методом ПЦР в режиме реального времени на приборе StepOnePlus («ABI Technologies», США) с использованием реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR+HighROX и ген-специфических праймеров, синтезированных компанией «Евроген» (Москва). Изменение уровня мРНК исследуемых генов при РШМ 0-IA стадии относительно нормального эпителия оценивали по методу  $-\Delta\Delta Ct$  (Livak, 2001) с учетом различий в

эффективности амплификации (E%), которую определяли методом кривых разведения кДНК-матрицы для каждой пары праймеров (Pfaffl, 2006); в качестве референсного гена использовали EEF1A1 (Leitao, 2014). Последовательности праймеров, условия амплификации и другие характеристики указаны в Таблице.

**Таблица.** Характеристика праймеров к нуклеотидным последовательностям исследуемых генов

Ген	NCBI RefSeq	Последовательность/локализация F – прямой праймер, R – обратный праймер)	Размер ампликона, п.о. / E %	Т °С отжига	Источник
EEF1A1	00140 2.5	F:5'-GTTGCGGTGGGTGTCATCA-3' (экзон 8) R:5'-GAGTGGGGTGGCAGGTATT-3' (экзон 8)			(Leitao, 2014)
VEGF-C	NM_00542 9.4	F:5'-CACGGCTTATGCAAGCAAAGA-3' (экзон 1) R:5'-TCCTTTCCTTAGCTGACACTTGT-3' (экзон 2)			
VEGF-R3	NM_18292 5.4	F:5'-AGTACATCAAGGCACGCATCGA-3' (экзон 3) R:5'-ACCAAGAGCGTGTTCAGGCTTGT-3' (экзон 4)			
PlGF	NM_00263 2.5	F:5'-CAGAGGTGGAAGTGGTACCCTTC C-3' (экзон 2) R:5'-CGGATCTTTAGGAGCTGCATGGTG AC-3' (экзон 4)	-		
ETS1	NM_00114 3820.1	F:5'-ACATCATCCACAAGACAGCGG-3' (экзон 10) R:5'-CACACACAAAGCGGTACACGT-3' (экзон 10)			

Образцы крови были получены от 35 пациенток с пре- и микроинвазивным РШМ непосредственно перед операцией. Контрольную группу составили 30 здоровых женщин, не имеющих патологий шейки матки и ВПЧ-инфекции. Иммунофенотипирование CD4-Tregs проводилось методом проточной цитофлуориметрии на приборе MACSQuant («Miltenyi Biotec», Германия) с использованием флуорофор-меченных моноклональных антител против CD-антигенов человека: CD4-FITC, CD25-APC, CD127-RPE, анти-FoxP3-RPE («Dako», Дания; «Miltenyi Biotec», Германия). В каждой пробе анализировали не менее 30 тыс. клеток. Содержание TGFβ1 в плазме крови больных и контрольной группы оценивалось методом иммуноферментного анализа с использованием набора Platinum ELISA («Bioscience», США); определение оптической плотности проводилось на приборе SpectraMax i3 («Molecular Devices», США). Статистическая достоверность оценивалась согласно критерия Уилкоксона-Манна-Уитни (при p<0.05 различия полагали достоверными).

## Результаты

Было установлено, что экспрессия генов VEGF-C, VEGF-R3, PlGF и ETS1 существенно увеличена в клетках РШМ, по сравнению с нормальным цервикальным эпителием (Рисунок 1). Также можно говорить о тенденции к увеличению содержания мРНК исследуемых генов по мере прогрессии опухоли от интраэпителиальной формы (0 стадия) к инвазивной (IA стадия), однако, достоверность этих различий на данном этапе работы не

подтверждается. Полученный результат указывает на очень раннее формирование лимфангиогенного профиля РШМ – на этапе преинвазивного роста, что, очевидно, является необходимой предпосылкой для последующей диссеминации опухолевых клеток. Наблюдаемое лимфангиогенное «переключение» затрагивает разные уровни – уровень ростовых факторов (VEGF-C, PlGF), их рецепторов (VEGF-R3) и эндотелий-специфичных внутриклеточных транскрипционных факторов (ETS1).

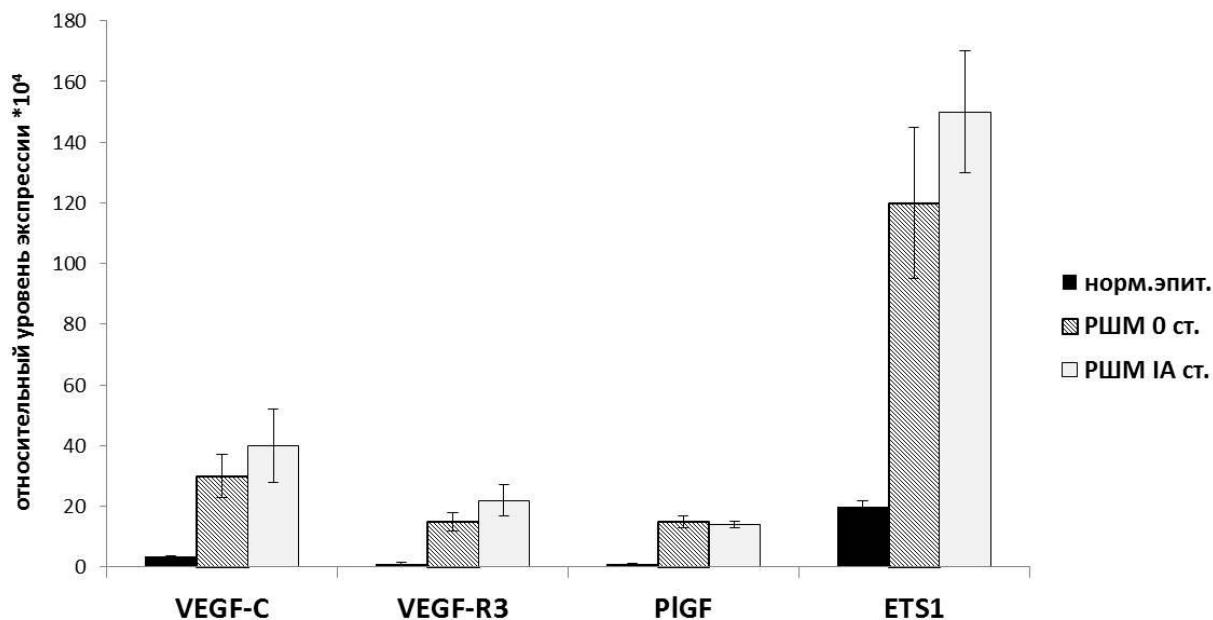


Рисунок 1. Изменение уровня экспрессии генов-регуляторов ангиогенеза в образцах РШМ относительно нормального эпителия. На гистограммах приведены средние значения и значения стандартных ошибок [M±m].

Figure 1. The change of expression levels of genes regulating angiogenesis in samples of cervical cancer (0-IA stage) vs. normal epithelium. Means and standard errors for each group are shown [M±m].

Также нами была проанализирована численность регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs) периферической крови, описываемых фенотипом CD4(+)/CD25(+)/high/CD127(dim/neg)/FoxP3(+) (Whiteside, 2012; Chen, 2013). Схема выделения интересующей клеточной субпопуляций (*gating strategy*) отражена на Рисунке 2. В группе больных РШМ 0-IA стадии было обнаружено увеличение количества CD4-Tregs, в сравнении с группой здоровых доноров (Рисунок 3), а именно зафиксировано достоверное повышение содержания клеток с фенотипом CD4(+)/CD25(+) (в особенности, фракции CD4(+)/CD25(high), характеризующейся наибольшей иммуносупрессорной активностью), CD4(+)/CD25(+)/CD127(dim/neg) и CD4(+)/CD25(+)/FoxP3(+). Значимых различий в отношении численности данной субпопуляции лимфоцитов между группами РШМ 0 и IA стадии выявлено не было. Аналогичная зависимость получена для уровня TGFβ1 в плазме крови испытуемых: для группы контроля его концентрация составила 8.7 ± 2.7 нг/мл, в то время как в группе больных пре-/микроинвазивным раком наблюдалось заметное повышение концентрации (28.4 ± 4.7 нг/мл и 22.7 ± 5.8 нг/мл для РШМ 0 и IA стадий, соответственно); закономерных различий между группами пациенток не наблюдалось. Исходя из полученных данных, можно предположить, что распространение Tregs в циркуляции и увеличение уровня секретируемого ими TGFβ1, способного индуцировать экспрессию факторов VEGF-сигнального пути опухолевыми и эндотелиальными клетками, происходит на наиболее ранних этапах развития РШМ.

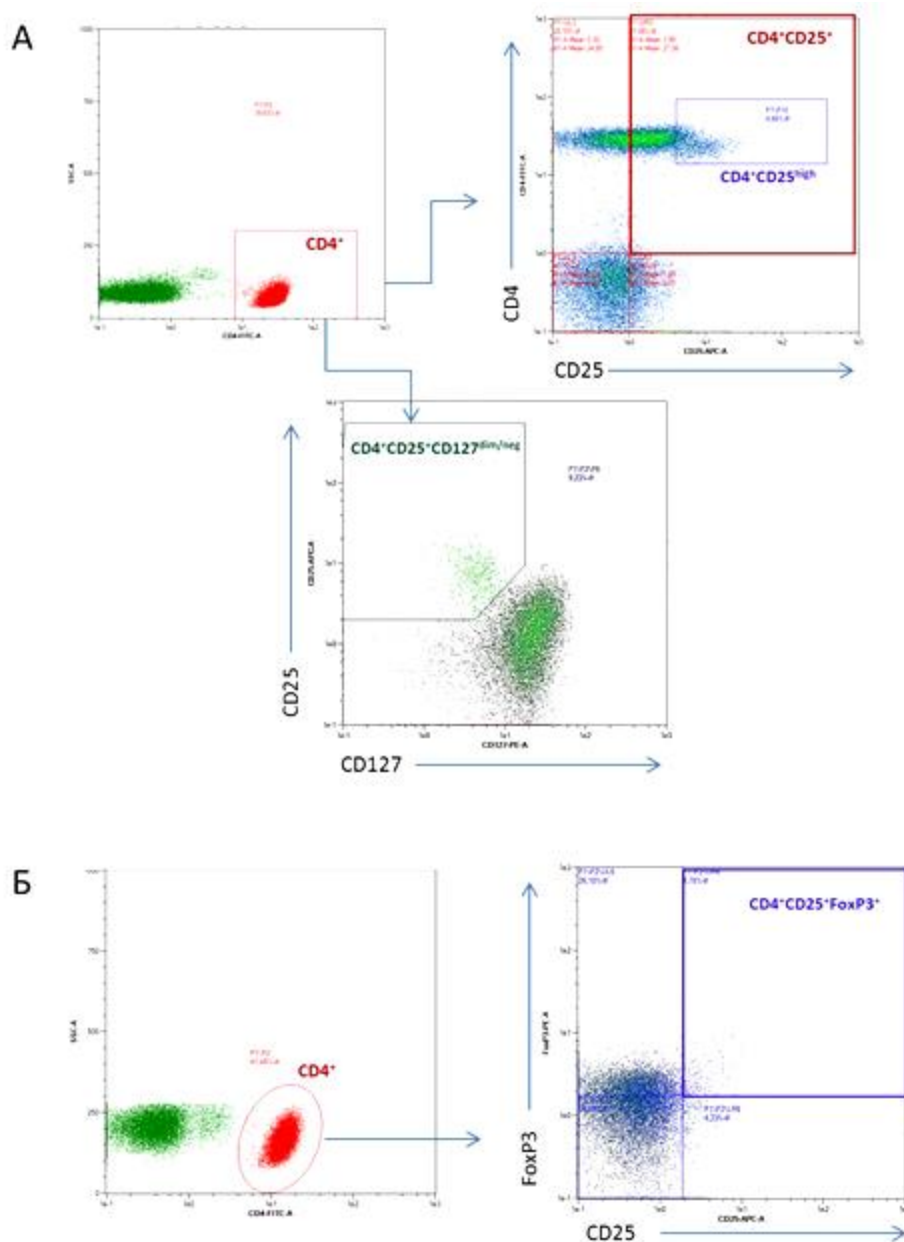


Рисунок 2. Схема анализа CD4 регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs) с фенотипом CD4(+) $CD25(+/high)CD127(dim/neg)$  (А) и CD4(+) $CD25(+)$ FoxP3(+) (Б) методом проточной цитофлуориметрии.

Figure 2. Scheme of gating the population of CD4 regulatory T-cells described by phenotypes: CD4(+) $CD25(+/high)CD127(dim/neg)$  (A) and CD4(+) $CD25(+)$ FoxP3(+) (B) using multi-color flow cytometry.

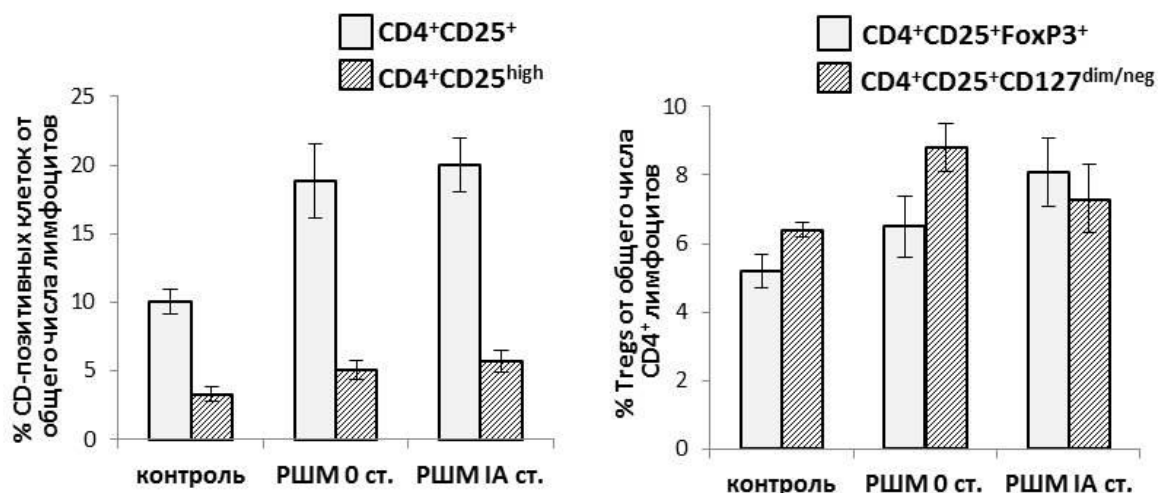


Рисунок 3. Изменение численности Tregs в периферической крови больных РШМ 0 и IA стадий по данным проточной цитофлуориметрии.

Figure 3. The change of circulating Tregs percentages in stage 0-IA cervical cancer patients vs. healthy donors.

## Заклучение

Таким образом, у больных ранними формами РШМ наблюдаются скоординированные изменения исследованных показателей, как на локальном, так и на системном уровнях, направленные на стимуляцию неоангиогенеза и, очевидно, формирующие основу для инвазии и раннего метастазирования клеток опухоли. Выявленные закономерности не только отражают возможные механизмы патогенеза РШМ, но также могут быть использованы для разработки методов ранней диагностики и лечения данного заболевания.

## Библиография

1. Chen Z, Ding J, Pang N, Du R, Meng W, Zhu Y, Zhang Y, Ma C, Ding Y. The Th17/Treg balance and the expression of related cytokines in Uygur cervical cancer patients. *Diagn Pathol* 2013, 8:61.
2. Depoix C, Tee MK, Taylor RN. Molecular regulation of human placental growth factor (PlGF) gene expression in placental villi and trophoblast cells is mediated via the protein kinase A pathway. *Reprod Sci* 2011, 18(3):219-228.
3. Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 2(8):a011056.
4. Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* 2012, 72(9):2162-2171.
5. James JM, Nalbandian A, Mukoyama YS. TGF $\beta$  signaling is required for sprouting lymphangiogenesis during lymphatic network development in the skin. *Development* 2013, 140(18):3903-3914.
6. Leitao MdCG, Coimbra EC, Lima RdCPd, Guimaraes Mde L, Heraclio Sde A, Silva Neto Jda C, de Freitas AC. Quantifying mRNA and MicroRNA with qPCR in Cervical Carcinogenesis: A Validation of Reference Genes to Ensure Accurate Data. *PLoS ONE* 2014, 9(11):e111021.
7. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods* 2001, 25(4):402-408.
8. Pfaffl MW. Relative quantification. In *Real-time PCR*. Edited by Dorak T. New York: Taylors & Francis Group; 2006: 63-82.

9. Pringels S, Van Damme N, De Craene B, Pattyn P, Ceelen W, Peeters M, Grooten J. Clinical procedure for colon carcinoma tissue sampling directly affects the cancer marker-capacity of VEGF family members. *BMC Cancer* 2012,12:515.
10. Randi AM, Sperone A, Dryden NH, Birdsey GM. Regulation of angiogenesis by ETS transcription factors. *Biochem Soc Trans* 2009, 37(Pt 6):1248-1253.
11. Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, Baithun S, Beasley N, Thiele W, Weich H, Krishnan J, Shepherd JH, Pepper MS, Jackson DG, Sleeman JP, Jacobs IJ. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol* 2003, 201(4):544-554.
12. Whiteside TL, Schuler P, Schilling B. Induced and natural regulatory T cells in human cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2012, 12(10):1383-1397.
13. Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Mihira H, Itoh T, Suehiro J, Yuki K, Harada K, Morikawa M, Iwata C, Minami T, Morishita Y, Kodama T, Miyazono K, Watabe T. Ets family members induce lymphangiogenesis through physical and functional interaction with Prox1. *J Cell Sci* 2011, 124(Pt 16):2753-2762.
14. Курмышкина О.В., Белова Л.Л., Ковчур П.И., Волкова Т.О. Ремоделирование ангиогенеза и лимфангиогенеза при развитии рака шейки матки // Биомедицинская химия. – 2015. – Т.61. – Вып.5. – С. 579-597.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов НК-1404-32098 (РФФИ), 11.G34.31.0052 (Постановление 220), Программы стратегического развития ПетрГУ на 2012-2016 гг. и Гос. задания на НИР.