

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.19-006.04-078.33

Новиков Д.В.¹, Фомина С.Г.¹, Гурина Н.Н.¹, Перенков А.Д.¹, Красногорова Н.В.¹, Шумилова С.В.¹,
Луковникова Л.Б.¹, Новиков В.В.¹, Караулов А.В.^{1,2}

КОРРЕЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ MUC1, ICAM1, IL32, FCGR3A И FOXP3 В ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», 603950, Нижний Новгород;

²ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, Москва

Гипогликозилированный муцин 1 (MUC1) часто избыточно экспрессируется в клетках карциномы молочной железы, что является неблагоприятным прогностическим маркером для больных раком молочной железы (РМЖ). Целью данного исследования явилась оценка в опухолевых очагах больных РМЖ взаимосвязи между экспрессией MUC1 и генов, принимающих участие в реализации иммунологических реакций. Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени исследовали экспрессию генов MUC1, Fas, ICAM1, FcγR3A, FcγR3B, FoxP3, IL2Ra, IL32 и TNF в опухолевых очагах 40 больных раком молочной железы. Уровень мРНК каждого из исследуемых генов оценивали относительно трех генов домашнего хозяйства. Частота обнаружения мРНК MUC1 составила 80%, мРНК Fas — 95%, мРНК ICAM1 — 97,5%, мРНК IL2Ra — 87,5%, мРНК FoxP3 — 85%, мРНК TNF — 95%, мРНК FcγR3A — 95%, мРНК FcγR3B — 32,5% и мРНК IL32 — 75%. Обнаружена прямая корреляция между уровнями мРНК MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A и FoxP3. Наиболее тесная связь регистрировалась между уровнями экспрессии генов MUC1 и IL32 ($r = 0,72$; $p = 0,0001$). По сравнению с MUC1-негативными, MUC1-позитивные карциномы молочной железы характеризовались более высоким уровнем мРНК провоспалительных цитокинов IL32 и TNF, молекулы адгезии ICAM1 и молекулярного маркера T-регуляторных клеток FoxP3. Данный профиль экспрессии генов в опухолях больных РМЖ показывает связь экспрессии MUC1 с воспалением и его модуляцией T-регуляторными клетками. Обсуждается влияние экспрессии исследуемых генов на фенотип раковых клеток и течение заболевания.

Ключевые слова: рак молочной железы; воспаление; MUC1; ICAM1; IL32; FcγR3A; FoxP3.

Для цитирования: Новиков Д.В., Фомина С.Г., Гурина Н.Н., Перенков А.Д., Красногорова Н.В., Шумилова С.В., Луковникова Л.Б., Новиков В.В., Караулов А.В. Корреляция экспрессии MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A и FoxP3 в опухолевых очагах больных раком молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (1): 35-39. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-35-39>

Novikov D.V.¹, Fomina S.G.¹, Gurina N.N.¹, Perenkov A.D.¹, Krasnogorova N.V.¹, Shumilova S.V.¹, Lukovnikova L.B.¹,
Novikov V.V.¹, Karaulov A.V.^{1,2}

THE CORRELATION OF EXPRESSION OF MUC1, ICAM1, IL32, FCGR3A AND FOXP3 IN TUMOR NIDUS OF PATIENTS WITH BREAST CANCER

¹The N.I. Lobachevskii National research Nizhegorodskii state university, 603950 Nizhniy` Novgorod, Russia

²The I.M. Sechenov first Moscow state medical university of Minzdrav of Russia, 119992, Moscow, Russia

The hypo-glycosylated mucin 1 (MUC 1) frequently is redundantly expressed in cells of breast carcinoma that is considered as an unfavorable prognostic marker for patients with breast cancer. The purpose of study is to evaluate in tumor areas of patients with breast cancer the interrelationships between expression of MUC 1 and genes participating in implementation of immune reactions. The technique of polymerase chain reaction with reverse transcription in real-time was applied to investigate expression of genes of MUC 1, Fas, ICAM 1, FcγR3A, FcγR3B, FoxP3, IL2Ra, IL32 and TNF in tumor areas of 40 patients with breast cancer. The level of mRNA of each of analyzed genes was evaluated relatively to three genes of household. The rate of detection of mRNA MUC 1 amounted to 80%, mRNA Fas - 95%, mRNA ICAM 1 - 97.5%, mRNA FcγR3A - 95%, mRNA FcγR3B - 32.5%, mRNA FoxP3 - 85%, mRNA IL2Ra - 87.5%, mRNA IL32 - 75%, mRNA TNF - 95%. The direct correlation was established between levels of mRNA MUC 1, ICAM 1, IL32, FcγR3A and FoxP3. The most strong relationship was registered between levels of expression of genes MUC 1 and IL32 ($r=0.72$; $p=0.0001$). In comparison with MUC 1 negative breast carcinoma, MUC 1 positive breast carcinoma characterized by higher level of mRNA of pro-inflammatory cytokines IL32 and ETA, molecules of adhesion ICAM 1 and molecular marker of T-regulative cells FoxP3. The given profile of expression of genes in tumors of patients with breast cancer demonstrates relationship of expression of MUC 1 with inflammation and its modulation by T-regulative cells. The effect of expression of analyzed genes on phenotype of cancer cells and course of disease are discussed.

Key words: breast cancer; inflammation; MUC 1; ICAM 1; IL32; FcγR3A; FoxP3

For citation: Novikov D.V., Fomina S.G., Gurina N.N., Perenkov A.D., Krasnogorova N.V., Shumilova S.V., Lukovnikova L.B., Novikov V.V., Karaulov A.V. The correlation of expression of MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A and FoxP3 in tumor nidus of patients with breast cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (1): 35-39. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-35-39>

For correspondence: Karaulov A.V., corresponding member of the Russian academy of sciences, doctor of medical sciences, professor, head of the chair of clinical immunology and allergology of the I.M. Sechenov first Moscow state medical university. e-mail: drkaraulov@mail.ru

Для корреспонденции: Караулов Александр Викторович, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., зав. каф. клин. иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, e-mail: drkaraulov@mail.ru

Information about authors:

Novikov D.V., <http://orcid.org/0000-0001-7049-6935>
Fomina S.G., <http://orcid.org/0000-0002-6610-1774>
Gurina N.N., <http://orcid.org/0000-0001-8025-7292>
Perenkov A.D., <http://orcid.org/0000-0002-0710-6882>
Krasnogorova N.V., <http://orcid.org/0000-0002-8800-4553>
Shumilova S.V., <http://orcid.org/0000-0002-2727-2888>
Lukovnikova L.B., <http://orcid.org/0000-0002-5489-4623>
Novikov V.V. <http://orcid.org/0000-0002-2449-7213>
Karaulov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study was supported by the Minobrnauki of Russia within the framework of the state research task (project № 20.223.2014/K)*

Received 22.06.2016
Accepted 01.07.2016

Введение. Микроокружение опухоли играет ключевую роль в прогрессии рака молочной железы (РМЖ). В опухолевых очагах кроме раковых клеток присутствуют эндотелиальные и периваскулярные клетки, адипоциты, фибробласты и активированные клетки иммунной системы. Наиболее представленными являются макрофаги, которые во многом определяют взаимодействие иммунной системы и опухолевых клеток. Присутствие в опухолевом очаге повышенного количества инфильтрирующих лимфоцитов и цитотоксических Т-клеток ассоциировано с успешным ответом на химиотерапию [1] и снижением риска смерти от болезни у пациентов с HER₂-положительными опухолями [2]. Вместе с тем иммунная система может способствовать как росту опухоли, так и метастазированию. Воспалительные процессы, которые сопутствуют развитию опухолевой ткани, приводят к состоянию, сходному с таковым при заживлении ран. Продукция клетками микроокружения опухоли и самими клетками опухоли биологически активных молекул опосредует сигналы к перестройке метаболизма раковых клеток, пролиферации, ангиогенезу и миграции, что в итоге влияет на выживаемость пациентов и ответ на терапию [3].

Муцин 1 (*MUC1*, *CD227*) является опухолеассоциированным антигеном, который избыточно экспрессируется в карциномах молочной железы. В эпителиальных клетках *MUC1* сильно гликозилирован и экспрессируется исключительно на апикальной поверхности. В раковых клетках *MUC1* гипогликозилирован и распределен по всей поверхности клетки. Кроме того, значительное количество *MUC1* обнаруживается в ядре и митохондриях [4]. На мембране раковой клетки *MUC1* участвует в сигнальных взаимодействиях и контактах между клетками и матриксом. В ядре *MUC1* взаимодействует с различными факторами транскрипции и элементами промоторных регионов [5]. Экспрессия *MUC1* в раковых клетках вызывает транскрипционные изменения, опосредующие общую выживаемость в ответ на гипоксию, недостаток питательных веществ и воздействие иммунной системы [6]. Экспрессия *MUC1* опухолевыми клетками является неблагоприятным прогностическим маркером при РМЖ [7]. В настоящее время *MUC1* рассматривается как мишень для направленной иммунотерапии карцином различных локализаций, включая РМЖ [8]. Ранее S. Cascio и соавт. показали, что *MUC1* регулирует транскрипцию провоспалительных цитокинов в культурах раковых клеток путем связывания с промоторами генов в комплексе с ядерным фактором κB p65 [9].

В настоящей работе показано, что в сравнении с *MUC1*-негативными (*MUC1*⁻), *MUC1*-позитивные (*MUC1*⁺) карциномы у больных РМЖ характеризуются более высоким уровнем мРНК провоспалительных цитокинов IL32 и TNF, а также более высоким уровнем мРНК маркера Т-регуляторных клеток FoxP3 и мРНК молекулы адгезии ICAM1.

Материал и методы. В исследование включены 40 больных РМЖ, проходивших хирургическое лечение в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все больные дали согласие на участие в исследовании. После хирургического удаления тканей фрагмент опухолевого очага размером 0,5 см³ помещали в 0,5 мл лизирующего буфера (4М гуанидин тиоцианат, 100 мМ ацетат натрия, 1% Тритон X-100) и замораживали при –20°C. Суммарную нуклеиновую кислоту выделяли из 200 мкл лизата методом фенол-хлороформной экстракции. Полученный препарат нуклеиновой кислоты обрабатывали ДНКазой I («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) и синтезировали кДНК с использованием M-MLV ревертазы (ЗАО «Силекс», Россия). Полученную кДНК амплифицировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

В каждом образце оценивали уровень мРНК *MUC1*, Fas (CD95), ICAM1 (CD54), FcγR3A (CD16A), FcγR3B (CD16B), FoxP3, IL2Rα (CD25), IL32 и TNF. Для нормировки использовали мРНК генов домашнего хозяйства: убиквитина С (UBC), бета-2-микроглобулина (β2M), гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT1), бета-актина (βA), тирозин 3-монооксигеназы/триптофан 5-монооксигеназы, активационного протеина зета (YWHAZ). Определение уровня мРНК исследуемого гена и гена домашнего хозяйства проводили в одной пробирке с использованием зондов TaqMan. Смесь ПЦР объемом 25 мкл содержала 2 мкл кДНК, по 0,4 пМ праймеров и зондов TaqMan, 0,8 мМ дНТФ, 2 мМ MgCl₂, 2,5 единицы активности Taq-полимеразы (ЗАО «Силекс», Россия). Реакцию проводили в амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США). Первичная структура используемых праймеров и зондов представлена в табл. 1.

В каждом образце проводили нормировку уровней исследуемых мРНК по трем генам домашнего хозяйства. В расчетах учитывали эффективность реакции, которую вычисляли по стандартной прямой, построенной по результатам последовательных разбавлений. Относительные уровни мРНК оценивали методом сравнения пороговых циклов (ΔΔCt). Для поиска взаимосвязей между экспрессией генов внутри одного образца использовали уровни мРНК, нормированные относительно одного гена домашнего хозяйства. При сравнении уровней мРНК между образцами нормировочный коэффициент рассчитывали как среднее геометрическое значение уровней мРНК, полученных относительно нескольких генов домашнего хозяйства.

Статистические вычисления проводили с использованием компьютерной программы GraphPad Prism 5.0 («GraphPad Software Inc.», США). Соответствие распределения количественных признаков нормальному закону оценивали критерием Колмогорова—Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Оценку взаимосвязей между уровнями мРНК проводили по

Таблица 1

Олигонуклеотиды, используемые для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени

мРНК		Олигонуклеотид (5' → 3')
UBC	F	GCACAGCTAGTTCGTCGCA
	R	TGCATTGTCAAGTGACGAT
	Z	CY5-ATTTGGGTGCGAGTCTTTGTTTGTGGAT-BHQ-2
HPRT1	F	CTGAAGAGCTATTGTAATGA
	R	TTATATCCAACACTTCGTGG
	Z	CY5-AGATATAATTGACACTGGCAAAACAATGCA-BHQ-2
B2M	F	CTGGAGGCTATCCAGCGTAC
	R	GCTTACATGTCTCGATCCCA
	Z	CY5-TTCAGTTTACTCACGTCATCCAGCA-BHQ-2
BA	F	AGCCTTCCTCCTGGGCATG
	R	AGGAGGAGCAATGATCTTGA
	Z	CY5-CTGTGTTGGCGTACAGGTCTTTGCGG-BHQ-2
YWHAZ	F	TGCAATGATGACTGTCTCT
	R	ACTGATCGACAATCCSTTTC
	Z	CY5-ATTACTACCGTACTTGGCTGAGGTTGCC-BHQ-2
MUC1	F	CGCTGGCCATTGTCTATCTCA
	R	AGAGGCTGCTGCCACCATTA
	Z	ROX-CTTGGCTGTCTGTCAAGTCCGCGAAAG-BHQ-2
Fas	F	ACCAAATGTGAACATGGAAT
	R	CTTTCTGTGCTTTCTGCAT
	Z	ROX-TCAAGGAATGCACACTCACCAGCAACACCA-BHQ-2
IL32	F	CTGAAGGCCCGAATGCACCA
	R	TAGAGGAGTGAGCTCTGGGT
	Z	FAM-AGGGTACTCTGGAGACAGTGGCGGCTTA-BHQ-1
FcγR3A/B	FA/B	GCTCTGCTACTTCTAGTTTCA
	RA	CACTGTCCTTCTCGAGCACC
	RB	CACTGTCCTTCTCAAGCACC
	ZA/B	ROX-CTGTGGTGTTCCTGGAGCCTCAATGGTA-BHQ-2
ICAM-1	F	GAGCTTCGTGCTCTGTATGG
	R	CTCATACCGGGGGAGAGCA
	Z	ROX-CCCATTGCCGAGCTCAAGTGTCTAAAGGA-BHQ-2
FoxP3	F	GAGAAGCTGAGTGCCATGCA
	R	GGAGCCCTTGTCGGATGAT
	Z	FAM-TGCCATTTTCCAGCCAGGTGG-BHQ-1
IL2Rα	F	CTGCTCACGTTTCATCATGGT
	R	AGTTCAACATGGTTCTCTCC
	Z	ROX-TGACGATGACCCGCCAGAGATCCACACGC-BHQ-2
TNF	F	CTCTTCTCCTTCTGATCGTG
	R	TTGAGGGTTTGCTACAACATGG
	Z	ROX-AGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATC-BHQ-2

Спирмену. Для сравнения уровней между группами применяли U-критерий Манна—Уитни. Различия считали статистически достоверными при значениях $p < 0,05$.

Результаты. В образцах опухолевых очагов частота обнаружения мРНК *MUC1* составила 80%, *Fas* (CD95) — 95%, *ICAM1* (CD54) — 97,5%, *IL2Rα* (CD25) — 87,5%, *FoxP3* — 85%, *TNF* — 95%, *FcγR3A* — 95%, *FcγR3B* — 32,5% и *IL32* — 75%.

Для оценки путем совместной амплификации относительных уровней мРНК подбирали пары, включающие ген домашнего хозяйства и ген интереса. Выбор гена домашнего хозяйства проводили на основе эффективности реакции при совместной амплификации с кДНК исследуемого гена в одной пробирке. Использовали пары генов, в которых значение эффективности реакции для обеих мРНК было не ниже 0,7. Для нормировки уровня мРНК *MUC1* заданным условиям соответствовали мРНК *BA*, *B2M* и *YWHAZ*; для нормировки уровня мРНК *ICAM1*, *FcγR3A*, *FcγR3B* и *TNF* — мРНК *BA*, *UBC* и *YWHAZ*; для нормировки уровня мРНК *Fas*, *FoxP3* и *IL2Rα* — мРНК *B2M*, *HPRT1* и *YWHAZ*; для нормировки уровня мРНК *IL32* — мРНК *B2M*, *UBC* и *YWHAZ*.

В большинстве исследуемых образцов числовые значения относительных уровней мРНК *MUC1*, *ICAM1*, *Fas*, *TNF*, *IL32*, *FcγR3A* и *IL2Rα* варьировали в пределах 0,1—3 единицы. Для мРНК *FoxP3* и *FcγR3B* регистрировались более низкие числовые значения уровней мРНК, составляющие сотые и тысячные доли от уровней экспрессии референтных генов. Низкие значения свидетельствуют о том, что наблюдаемый уровень мРНК является характеристикой небольшого числа клеток опухолевого очага больных РМЖ, вероятно, относящихся к лимфоцитам, инфильтрованным в опухоль.

Прямая корреляционная связь обнаружена одновременно между уровнями мРНК *MUC1*, *ICAM1*, *IL32*, *FcγR3A* и *FoxP3*, причем связь между уровнями мРНК *MUC1* и *IL32* была наиболее тесной (табл. 2). Следует отметить, что мРНК *IL32* была обнаружена только в двух *MUC1*-образцах опухолевого очага больных РМЖ. Оценка тесноты связи экспрессии *FcγR3B* с уровнями мРНК других генов не проводилась, поскольку мРНК *FcγR3B* была выявлена лишь в трети (13 из 40) исследуемых образцов.

Сравнение относительных уровней мРНК в *MUC1*-позитивных (*MUC1*⁺) и негативных (*MUC1*⁻) опухолевых очагах показало, что уровни мРНК *ICAM1*, *TNFα*, *IL32* и *FoxP3* статистически значимо выше в *MUC1*⁺ карциномах (см. рисунок). Наиболее яркие различия регистрировались между уровнями мРНК *IL32* в *MUC1*⁺ и *MUC1*⁻ опухолевых очагах. В *MUC1*-негативных опухолях регистрировался высокий уровень мРНК *Fas*, однако различия не имели статистической значимости. В *MUC1*⁺ карциномах дополнительно к мРНК *ICAM1*, *IL32* и *FoxP3* регистрировали более высокий уровень мРНК *TNF*, который, однако, не коррелировал с уровнями мРНК других генов.

Обсуждение. На основе экспрессии генов РМЖ принято разделять на молекулярные подтипы, которые тесно связаны с клиническими проявлениями заболевания и чувствительностью к лекарственным средствам. В то же время в ряде исследований показано, что молекулярный подтип и характер воспалительного процесса в месте локализации опухоли являются двумя независимыми особенностями РМЖ [10—12]. В настоящей работе выявлена значимая прямая корреляция между экспрессией генов *MUC1*, *ICAM1*, *IL32*, *FcγR3A* и *FoxP3* в опухолевых очагах РМЖ. Наибольшей теснотой свя-

Таблица 2

Коэффициенты парных корреляций между уровнями исследуемых мРНК, рассчитанные относительно мРНК *YWHAZ*

	Коэффициент корреляции Спирмена							
	<i>MUC1</i>	<i>ICAM1</i>	<i>Fas</i>	<i>TNF</i>	<i>IL32</i>	<i>FcyR3A</i>	<i>IL2Ra</i>	<i>FoxP3</i>
<i>MUC1</i>		0,46	-0,2	0,08	0,72	0,45	0,15	0,47
<i>ICAM1</i>	0,003		0,08	0,24	0,41	0,49	0,12	0,64
<i>Fas</i>	0,06	0,17		0,08	-0,28	0,09	0,12	-0,04
<i>TNF</i>	0,61	0,15	0,63		0,16	-0,05	-0,25	-0,07
<i>IL32</i>	0,0001	0,008	0,07	0,32		0,49	0,13	0,43
<i>FcyR3A</i>	0,004	0,0001	0,19	0,75	0,001		-0,04	0,24
<i>IL2Ra</i>	0,36	0,48	0,45	0,13	0,43	0,8		0,29
<i>FoxP3</i>	0,003	0,67	0,80	0,68	0,006	0,14	0,29	

зи обладали *MUC1* и *IL32*. При сравнении уровней экспрессии исследуемых генов было показано, что в *MUC1*⁺ карциномах дополнительно к *ICAM1*, *IL32* и *FoxP3* регистрировался более высокий уровень экспрессии *TNF*, который, однако, не коррелировал с уровнями мРНК других генов. Полученные данные свидетельствуют, что *MUC1*-позитивные карциномы молочной железы характеризуются высоким уровнем медиаторов воспаления. Ранее было показано, что экзогенные провоспалительные цитокины, такие как *TNF* и интерферон-гамма, приводят к повышению экспрессии *MUC1* в карциномах молочной железы [13]. Внутриклеточная локализация *MUC1* сопровождается повышением экспрессии *TNF* в модельных линиях клеток РМЖ [9]. *TNF* является мощным индуктором экспрессии эндогенного *IL-32*, а *IL-32* сам по себе способствует длительной продукции *TNF* [14]. Таким образом, совместная экспрессия *MUC1*, *IL32* и *TNF* способствует автостимуляции провоспалительного каскада. Ранее показано, что *MUC1* и *IL32* способствуют пролиферации и снижают апоптоз линий клеток РМЖ [15]. Обнаруженный нами низкий уровень мРНК *Fas* в *MUC1*⁺ опухолях РМЖ косвенно подтверждает эти данные (см. рисунок).

Высокий уровень экспрессии мРНК *FoxP3* в *MUC1*⁺ опухолевых очагах РМЖ отражает присутствие большого числа регуляторных Т-клеток (Трег) по сравнению с *MUC1*⁻ карциномами РМЖ. По литературным данным известно, что привлечение Трег в опухолевое микроокружение является одной из основных стратегий, используемых раковыми клетками для подавления иммунитета и уклонения от иммунного над-

зора [16]. Показано также, что присутствие *FoxP3*⁺ Трег клеток в опухолевых очагах больных РМЖ приводит к повышенному метастатическому потенциалу клеток опухоли [17]. Отсутствие связи между уровнями мРНК *FoxP3* и мРНК другого маркера Трег клеток — *IL2Ra*, по-видимому, объясняется экспрессией *IL2Ra* клетками самой опухоли.

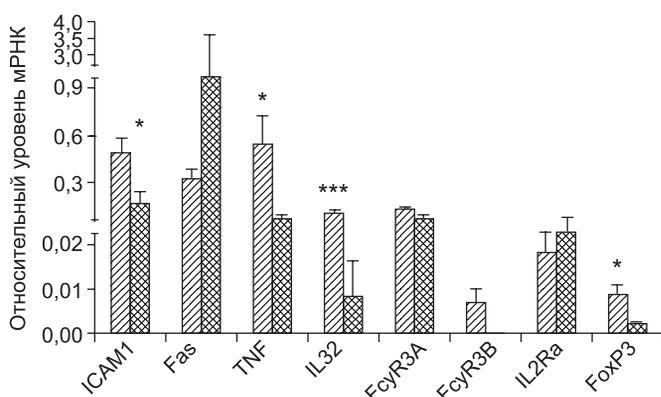
Экспрессия *ICAM1* не регистрируется в нормальном эпителии молочной железы [18]. В нашем исследовании мРНК *ICAM1* детектировалась в большинстве исследуемых образцов опухолевых очагов, а в *MUC1*-позитивных опухолях регистрировался более высокий уровень экспрессии мРНК *ICAM1*. Ранее показано, что *MUC1*⁺ клетки РМЖ способны мигрировать по поверхности или через слой *ICAM1*-экспрессирующих клеток с помощью прямых взаимодействий между *MUC1* и *ICAM1* [19]. В гене *ICAM1* описаны генетические перестройки [20] и его экспрессия клетками РМЖ тесно связана со способностью к метастазированию [21]. Корреляция между уровнями мРНК *ICAM1* и *FoxP3* свидетельствует, что изменение уровня экспрессии *ICAM1* опосредует инфильтрацию Трег в опухолевый очаг.

Интересным является обнаружение высокого уровня экспрессии гена *FcyR3A* клетками РМЖ и ее корреляция с экспрессией генов провоспалительных цитокинов. Высокий уровень мРНК *FcyR3A* в опухолевых очагах свидетельствует в пользу его экспрессии раковыми клетками. Ранее было показано, что при прогрессии РМЖ повышение уровня мРНК *FcyR3A* происходит перед морфологическими изменениями опухолевых клеток [22]. Какие функции выполняет *FcyR3A* в раковой клетке, остается неизвестным. Экспрессия молекулярного маркера нейтрофилов *FcyR3B* выявлена только в трети исследуемых образцов, причем все опухоли были *MUC1*⁺.

Таким образом, показана связь экспрессии генов *MUC1*, *ICAM1*, *IL32*, *FcyR3A* и *FoxP3* в опухолевых очагах больных РМЖ. По сравнению с *MUC1*-негативными, *MUC1*-позитивные карциномы характеризуются более высоким уровнем мРНК провоспалительных цитокинов *IL32* и *TNF*, молекулы адгезии *ICAM1* и маркера Трег-клеток *FoxP3*. Данный профиль экспрессии генов в опухолях больных РМЖ показывает связь экспрессии *MUC1* с воспалением и его регуляцией с помощью *FoxP3*⁺ Трег.

Финансирование. Исследование было поддержано Министерством образования и науки РФ в рамках проектной части государственного задания в сфере научной деятельности (№ 20.223.2014/К).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



Сравнение относительных уровней мРНК исследуемых генов в *MUC1*⁺ ($n = 32$) и *MUC1*⁻ ($n = 8$) опухолевых очагах больных РМЖ (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—11, 13—15, 17—19, 21—22 см. REFERENCES)

12. Скотаренко Л.В., Воротников И.К., Кадагидзе З.Г., Шамилов Ф.А. Особенности Т-клеточного иммунитета при раке молочной железы. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2011; (4): 24—7.

16. Колядина И.В., Поддубная И.В., van de Velde с. J.H., Kuppen P., Франк Г.А., Комов Д.В. и др. Иммунная гетерогенность рака молочной железы I стадии: биологическое, популяционное и прогностическое значение (опыт международного сотрудничества). *Современная онкология*. 2015; 17(1): 30—8.

20. Новиков В.В., Шумилова С.В., Новиков Д.В., Калугин А.В., Фомина С.Г., Караулов А.В. Генетическая нестабильность в локусе rs5498 E469K (A/G) гена *ICAM-1* у больных раком толстой кишки и молочной железы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 160(12): 783—6.

REFERENCES

1. Kroemer G., Senovilla L., Galluzzi L., André F., Zitvogel L. Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nat. Med.* 2015; 21: 1128—38.
2. Ali H.R., Provenzano E., Dawson S.J., Blows F.M., Liu B., Shah M. et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann. Oncol.* 2014; 25: 1536—43.
3. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140: 883—99.
4. Raina D., Ahmad R., Rajabi H., Panchamoorthy G., Kharbanda S., Kufe D. Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2012; 40: 1643—9.
5. Behrens M.E., Grandgenett P.M., Bailey J.M., Singh P.K., Yi C.H., Yu F. et al. The reactive tumor microenvironment: MUC1 signaling directly reprograms transcription of CTGF. *Oncogene.* 2010; 29: 5667—77.
6. Nath S., Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* 2014; 20(6): 332—42.
7. Khodarev N.N., Pitroda S.P., Beckett M.A., MacDermed D.M., Huang L., Kufe D.W. et al. MUC1-induced transcriptional programs associated with tumorigenesis predict outcome in breast and lung cancer. *Cancer Res.* 2009; 69: 2833—7.
8. Mohit E., Hashemi A., Allahyari M. Breast cancer immunotherapy: monoclonal antibodies and peptide-based vaccines. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2014; 10(7): 927—61.
9. Cascio S., Zhang L., Finn O.J. MUC1 protein expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with nuclear factor- κ B p65 and binding to cytokine promoters. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(49): 42248—56.
10. Bertucci F., Finetti P., Rougemont J., Charafe-Jauffret E., Cervera N., Tarpin C. et al. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 2170—8.
11. Masuda H., Baggerly K.A., Wang Y., Iwamoto T., Brewer T., Pusztai L. et al. Comparison of molecular subtype distribution in triple-negative inflammatory and non-inflammatory breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2013; 15(6): R112. Available at: <http://breast-cancer-research.com/content/15/6/R112> (accessed 17 June 2016).
12. Skotarenko L.V., Vorotnikov I.K., Kadagidze Z.G., Shamilov F.A. The specific features of T cell immunity in breast cancer. *Opukholy zhenskoy reproduktivnoy sistemy.* 2011; (4): 24—7. (in Russian)
13. Lagow E.L., Carson D.D. Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* 2002; 86: 759—72.
14. Heinhuis B., Koenders M.I., van Riel P.L., van de Loo F.A., Dinarello C.A., Netea M.G. et al. Tumour necrosis factor alpha-driven IL-32 expression in rheumatoid arthritis synovial tissue amplifies an inflammatory cascade. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70(4): 660—7.
15. Wang S., Chen F., Tang L. IL-32 promotes breast cancer cell growth and invasiveness. *Oncol. Lett.* 2015; 9(1): 305—7.
16. Kolyadina I.V., Poddubnaya I.V., van de Velde s. J.H., Kuppen P., Frank G.A., Komov D.V. et al. Immunological heterogeneity of stage and breast cancer: biological, population-based and prognostic value (international cooperation experience). *Sovremennaya onkologiya.* 2015; 17(1): 30—8. (in Russian)
17. Tan W., Zhang W., Strasner A., Grivennikov S., Cheng J.Q., Hoffman R.M. et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature.* 2011; 470(7335): 548—53.
18. Guo P., Huang J., Wang L., Jia D., Yang J., Dillon D.A. et al. ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2014; 111(41): 14710—5.
19. Geng Y., Yeh K., Takatani T., King M.R. Three to tango: MUC1 as a ligand for both E-selectin and ICAM-1 in the breast cancer metastatic cascade. *Front. Oncol.* 2012; 2: 76. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00076/full> (accessed 17 June 2016).
20. Novikov V.V., Shumilova S.V., Novikov D.V., Kalugin A.V., Fomina S.G., Karaulov A.V. Genetic Instability in Locus rs5498 E469K (A/G) of ICAM-1 Gene in Patients with Colorectal Cancer and Breast Cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016; 160(6): 811—3.
21. Di D., Chen L., Wang L., Sun P., Liu Y., Xu Z. et al. Downregulation of human intercellular adhesion molecule-1 attenuates the metastatic ability in human breast cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 2016; 35(3): 1541—8.
22. Castro N.P., Osorio C.A., Torres C., Bastos E.P., Mourão-Neto M., Soares F.A. et al. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(5): R87. Available at: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2157> (accessed 17 June 2016).

Поступила 22.06.16
Принята к печати 01.07.16