

УДК 618.11-006.6-008.8:612.-17.1

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЩЕГО И ЛОКАЛЬНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКА

Златник Е.Ю., Неродо Г.А., Бахтин А.В., Новикова И.А., Мкртчян Э.Т., Арджа А.Ю.
ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
Ростов-на-Дону, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru, rnioi@list.ru).

Изучали основные структурные элементы локального иммунитета у больных раком яичника в асцитной жидкости в сравнении с периферической кровью: определяли уровни Т-лимфоцитов, в т.ч., с иммунофенотипом наивных и клеток памяти в субпопуляциях CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток, NK- и В-лимфоцитов. Обнаруженные у больных изменения показателей иммунного статуса свидетельствуют об угнетении адаптивного иммунитета (снижение в крови больных процента CD3+CD8+ и В-лимфоцитов при повышении уровня NK-клеток, возможно, компенсаторного). Продемонстрировано преобладание Т-клеток памяти у больных по сравнению со здоровыми женщинами, а также в асцитной жидкости больных по сравнению с их периферической кровью.

Ключевые слова: рак яичника, кровь, асцитная жидкость, субпопуляции лимфоцитов.

CHARACTERISTICS OF LOCAL AND SYSTEMIC IMMUNITY IN PATIENTS WITH OVARIAN CANCER

Zlatnik E.Yu., Nerodo G.A., Bachtin A.V., Novikova I.A., Mkrтчian E.T., Arga` A.Yu.
The Russian Federation Ministry of Health, Rostov Cancer Research Institute FGBU, Rostov-on-Don,
e-mail: elena-zlatnik@mail.ru, rnioi@list.ru

The main structure elements of systemic and local cellular immunity in patients with ovarian cancer were studied in blood and ascitic fluid. Levels of T-lymphocytes including naïve and «memory» ones both in the subsets CD3+CD4+ and CD3+CD8+, of NK- and B- lymphocytes were count by flow cytometry. The results show depression of adaptive immunity in patients in comparison with healthy women (decrease of CD3+CD8+ and B-lymphocytes` per cent and increase of NK-cells` amount which might be compensatory). Apparent prevalence of lymphocytes with immunophenotype of «memory» T-cells was found in patients than in healthy women and in ascitic fluid than in blood.

Keywords: ovarian cancer, blood, ascitic fluid, lymphocytes` subsets.

Введение

Иммунная защита организма от опухоли осуществляется как на системном, так и на локальном уровне. Участие в ней клеточных структурных элементов (Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, NK-клеток) и их растворимых продуктов в настоящее время не подлежит сомнению [5, 6, 7]. Однако, хотя феномен инфильтрации опухоли иммунокомпетентными клетками давно известен, их роль в очаге расценивается двояко, т.е. они могут способствовать не только ее регрессии, но и росту, тем более, при распространенных стадиях [1, 2, 8, 12]. Изучение факторов локального иммунитета у онкологических больных представляет собой важную проблему, имеющую теоретические и прикладные аспекты. В частности, не исследовано значение Т-клеток памяти, несмотря на их возможную роль при заболеваниях с рецидивирующим течением, которое характерно для злокачественных опухолей. Поскольку современные методы иммунотерпии, например, с помощью цитотоксических препаратов, а также ЛАК- и ТП-клеток, адресуются к аутологичным лимфоцитам больных и рассчитаны на их хоуминг, представляется важным углубленное исследование

лимфоцитарных субпопуляций крови и других биологических и патологических жидкостей.

Целью данной работы является сравнительная характеристика структурных элементов общего и локального клеточного иммунитета у больных асцитными формами рака яичника.

Материалы и методы

Исследовано 20 парных образцов крови и асцитической жидкости (АЖ), взятых у первично выявленных больных асцитной формой рака яичника (РЯ) в возрасте от 25 до 73 лет со средней продолжительностью анамнеза 7 мес. Группу сравнения составили 20 практически здоровых женщин аналогичного возраста, у которых брали для исследования периферическую кровь.

В крови и АЖ определяли процентное содержание лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов. Среди субпопуляций Т-лимфоцитов оценивали общее количество CD3+ клеток, CD3+CD4+CD8-, CD3+CD4-CD8+, DN (CD3+CD4-CD8-); кроме того в каждой из основных субпопуляций подсчитывали содержание лимфоцитов с иммунофенотипом, характерным для Т-клеток памяти (CD3+CD4+CD45RO+CD45RA-, CD3+CD8+CD45RO+CD45RA-), и наивных Т-клеток (CD3+CD4+CD45RA+CD45RO-CD62L+ и CD3+CD8+CD45RA+CD45RO-CD62L+). Определяли также количество В-лимфоцитов (CD19+) и NK-

клеток (CD16+CD56+). Исследования выполняли с помощью проточного цитофлюориметра BD FACS CantoII и панелей моноклональных антител фирмы BD.

Статистическую обработку данных проводили параметрическими и непараметрическими методами (t-критерий Стьюдента, критерий Уилкоксона, метод непрямых разностей).

Результаты и обсуждение

Результаты представлены в табл. 1-4. В табл. 1 приведена сравнительная характеристика процентного содержания различных лейкоцитарных форменных элементов в крови и в АЖ больных асцитной формой РЯ и здоровых лиц.

Как видно из табл. 1, в крови больных наблюдается ряд отличий от показателей крови здоровых женщин: отмечен статистически достоверно более высокий процент гранулоцитов и более низкий – лимфоцитов. В АЖ больных РЯ определяется повышенное по сравнению с их кровью содержание лимфоцитов и моноцитов при более низком количестве гранулоцитов. Несмотря на вариабельность индивидуальных данных, направленность отличий показателей АЖ от периферической крови больных во всех исследованных пробах была сходной.

Оценка содержания популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток с панелью моноклональных антител Т-В-НК выявила в крови больных РЯ статистически значимо более низкие уровни Т-лимфоцитов с фенотипом CD3+CD8+ и В-лимфоцитов, а также более высокий – НК-клеток по сравнению с кровью здоровых женщин (табл. 2).

Статистически достоверных различий по общему количеству Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций, а также по уровням В- и НК-клеток между кровью и АЖ больных не отмечено; при этом количество НК-клеток в АЖ больных характеризовалось наиболее значительной вариабельностью.

Данные, представленные в табл. 3, демонстрируют различия содержания Т-лимфоцитов с иммунофенотипом Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в крови больных РЯ по сравнению с соответствующими показателями крови здоровых женщин. У больных выявлен статистически достоверно более высокий уровень Т-клеток памяти среди CD3+CD4+ и более низкий уровень наивных Т-лимфоцитов среди CD3+CD8+. Такие различия показаны при исчислении процентного содержания как от общего количества лимфоцитов, так и от каждой из основных субпопуляций. Статистически значимые различия по количеству наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти установлены также при сравнении показателей крови и АЖ больных (табл. 3), несмотря на одинаковые уровни основных Т-лимфоцитарных субпопуляций (CD3+CD4+ и CD3+CD8+) в этих биологических жидкостях. Выявлено статистически достоверно более высокое количество Т-клеток памяти в АЖ, чем в крови; процент наивных Т-лимфоцитов в АЖ был соответственно ниже. Такие различия наиболее очевидны при вычислении процента наивных клеток или клеток памяти от каждой из субпопуляций, а не от об-

Таблица 1

Состав лейкоцитарных форменных элементов в крови и АЖ больных РЯ

Пробы	Количество форменных элементов (%)		
	Лимфоциты	Моноциты	Гранулоциты
Здоровые женщины (кровь)	36,3±2,26	7,33±0,48	53,5±2,27
Больные РЯ (кровь)	15,5±2,5*	7,7±0,44	73,6±2,6*
Больные РЯ (АЖ)	50,4±6,0* **	21,5±5,1* **	22,3±5,6* **

Примечание. * - статистически достоверные отличия от показателей здоровых женщин; ** - статистически достоверные отличия от показателей крови больных (P<0,05)

Таблица 2

Количество лимфоцитов основных субпопуляций (Т-В- НК-) в крови и АЖ больных РЯ

Пробы	Количество лимфоцитов, %					
	CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	DN(CD3+CD4-CD8-)	CD19+	CD16+CD56+
Здоровые женщины (кровь)	72,5±2,53	44,4±1,82	24,4±2,7	1,89±0,24	14,0±1,0	12,5±2,54
Больные РЯ (кровь)	67,4±4,1	47,2±2,9	17,0±2,5*	1,88±0,36	6,6±2,0*	22,0±2,0*
Больные РЯ (АЖ)	71,0±4,54	47,9±3,0	23,5±3,73	2,04±0,38	6,8±1,1*	18,9±5,0

Примечание. * - статистически достоверные отличия от показателей здоровых женщин (P<0,05)

щего количества лимфоцитов, и показаны как для CD3+CD4+, так и для CD3+CD8+ клеток (табл. 3).

Таким образом, полученные результаты говорят о том, что у больных РЯ Т-клетки памяти, присутствующие в обеих субпопуляциях, концентрируются в асцитической жидкости, т.е., в области очага, а содержание в крови наивных Т-лимфоцитов, принадлежащих как к CD3+CD4+, так и к CD3+CD8+ клеткам, преобладает над их количеством в АЖ.

С целью более подробной характеристики клеточного состава лимфоцитов крови и АЖ нами было вычислено соотношение Тпам./Тнаив.; результаты представлены в табл. 4, наряду с широко известным показателем иммунорегуляторного индекса (CD3+CD4+/CD3+CD8+).

Как видно из табл. 4, соотношение CD3+CD4+/CD3+CD8+ в крови больных РЯ оказалось статистически достоверно выше, чем у здоровых женщин, что связано с более низким содержанием CD3+CD8+ лимфоцитов у больных. Поскольку эти клетки являются предшественниками цитотоксических Т-лимфоцитов, снижение их уровня, по-видимому, отражает истощение соответствующего звена иммунитета. Ин-

декс CD3+CD4+/CD3+CD8+ в АЖ не имеет статистически достоверных отличий от показателя крови больных. Соотношение клеток памяти и наивных лимфоцитов, относящихся к обеим основным Т-клеточным субпопуляциям, было существенно выше в АЖ. Это говорит о выраженном преобладании Т-лимфоцитов памяти над наивными Т-клетками именно в очаге по сравнению с периферической кровью, хотя пока не представляется возможным установить их специфичность и обосновать предположение об их возможной противоопухолевой активности.

Итак, обнаруженные у больных РЯ изменения показателей иммунного статуса свидетельствуют об угнетении адаптивного иммунитета, о чем говорит снижение в крови уровней CD3+CD8+ и В-лимфоцитов при повышении количества НК-клеток, возможно, компенсаторного.

Сопоставление показателей системного и локального клеточного иммунитета при асцитных формах РЯ продемонстрировало преобладание Т-клеток памяти с субпопуляционными рецепторами CD4 и CD8 у больных по сравнению со здоровыми женщинами, а также в АЖ по сравнению с периферической кровью, что, однако, не препятствует развитию опухоли.

Таблица 3

Количество Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов с фенотипом CD3+CD4+ и CD3+CD8+ в крови и АЖ больных РЯ

Пробы	Клетки памяти, %		Наивные клетки, %	
	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD3+CD4+	CD3+CD8+
Здоровые женщины (кровь)	55,0±3,67 24,0±1,52	35,0±4,3 8,44±1,06	23,4±3,2 10,6±1,8	27,7±3,7 6,44±0,9
Больные РЯ (кровь)	69,4±2,85* 31,5±2,24*	40,0±4,3 7,0±1,9	18,3±2,6 7,0±1,0	19,7±1,9* 3,5±0,6*
Больные РЯ (АЖ)	80,6±2,06* ** 33,7±2,39*	60,0±3,9* ** 12,0±2,9	8,33±1,44* ** 3,86±0,93* **	11,5±1,5* ** 2,16±0,32* **

Примечание. * - статистически достоверные отличия от показателей здоровых женщин; ** - статистически достоверные отличия от показателей крови больных (P<0,05); числитель - % от субпопуляции; знаменатель - % от общего количества лимфоцитов

Таблица 4

Соотношения различных субпопуляций Т-клеток в крови и АЖ больных РЯ

Пробы	CD3+CD4+/ CD3+CD8+	Клетки памяти/Наивные (% от каждой субпопуляции)	
		CD3+CD4+	CD3+CD8+
Здоровые женщины (кровь)	2,0±0,23	3,37±0,83	1,84±0,52
Больные РЯ (кровь)	3,1±0,33*	8,5±2,52	2,2±0,35
Больные РЯ (АЖ)	2,83±0,36	18,8±3,9* **	8,5±2,47* **

Примечание. * - статистически достоверные отличия от показателей здоровых женщин; ** - статистически достоверные отличия от показателей крови больных (P<0,05)

Более высокое количество моноцитов в АЖ по сравнению с кровью связано с их локальным присутствием в перитонеальной жидкости как в норме, так и при патологии. Опухолевые клетки, находящиеся в АЖ, видимо, активируют их, приводя к гиперпродукции цитокинов, особенно провоспалительных, содержание которых в АЖ при РЯ, как показано нами ранее, многократно превышает их уровни в крови [3]. Цитокины и хемокины вызывают миграцию лимфоцитов в перитонеальную полость, благодаря чему их содержание в АЖ существенно повышается. Преобладание среди них Т-клеток памяти, вероятно, происходит вследствие мобилизации адаптивного звена противоопухолевой защиты. Однако реализации ее эффекторных механизмов, по видимому, препятствует опухолевая иммуносупрессия, а также направленная миграция в зону опухолевого микроокружения естественных Т-регуляторных клеток, обладающих супрессорной активностью, количество которых по данным литературы в АЖ значительно выше, чем в крови [4]. Макрофаги 2-го типа (M-2), как известно, тоже могут проявлять иммуносупрессивное действие за счет аутокринной продукции VEGF, EGF, TGF β , IL-6, IL-8, IL-10, которые способны вырабатываться и опухолевыми клетками. Гипоксия, развивающаяся в опухолевой ткани, способствует поляризации цитотоксических M-1 в ростостимулирующие M-2 [2, 9, 12], что позволяет рассматривать моноциты АЖ как факторы поддержания опухолевого роста.

Возможно, применение воздействий, направленных на снятие локальной иммуносупрессии и стимулирующих активность Т-клеток памяти, среди которых описаны эффекторные клетки [10, 11], позволило бы добиться их результативного включения в противоопухолевый иммунный ответ с возможностью профилактики локальных рецидивов рака яичника.

Заключение

Иммунный статус больных асцитной формой РЯ характеризуется угнетением CD8 и В-звена по сравнению со здоровыми

женщинами. Факторы локального иммунитета у больных представлены высоким количеством моноцитов и лимфоцитов, среди которых преобладают Т-лимфоциты обеих основных субпопуляций с иммунофенотипом клеток памяти.

Список литературы

1. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. – Киев.: Наукова Думка, 2005. – 792 с.
2. Бережная Н.М. Роль системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины – участники воспаления // Онкология. – 2009. – Т.11. – №1. – С. 6-17.
3. Златник Е.Ю., Меньшенина А.П., Ушакова Н.Д. и др. Локальные уровни факторов гуморального иммунитета в асцитической жидкости больных раком яичника // Росс. аллергол. журн. – 2012. – №5. – Вып. 1. – С. 95-96.
4. Курганова Е.В., Тихонова М.А., Лебедева В.А. и др. Характеристика регуляторных Т-клеток у больных раком яичника // Сибирский онкол. журн. – 2008. – №6 (30). – С. 40-45.
5. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы – М.: ВИНТИ РАН, 2001. – 223 с.
6. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М.: Медицина, 1999. – 608 с.
7. Balkwill F. Cancer and the chemokine network // Nat. Res. Cancer. – 2004. – V.4. – №7. – P. 540-550.
8. Fidler I.J. The organ microenvironment and cancer metastasis // Differentiation. – 2002. – V. 70. – №9-10. – P.498-505.
9. Lewis C.E., Pollard W.J. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments // Cancer res. – 2006. – Vol. 66(2). – P.605-612.
10. Klebanoff C.A. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America July. – 2005. – Vol. 102 (27). – P. 9571-9576.
11. Pages F. et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer / Pages F., Berger A., Camus M., Sanchez-Cabo F., Costes A., Mollitor R., Mlecnik B., Kirilovsky A. Nilsson M., Damotte D., Meatchi T., Bruneval P., Cugnenc P.H., Trajanoski Z., Fridman W.H., Galon J. // N. Engl. J Med. – 2005. – Vol. 353. – P. 2654-2666.
12. Pollard J.W. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis // Nat. Rev. Cancer. – 2004. – V.4. – №1. – P. 71-78.