

ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ИММУННЫМ СТАТУСОМ И КОЛИЧЕСТВОМ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО ПРИ РАЗЛИЧНОЙ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ И ГИСТОГЕНЕЗЕ ОПУХОЛИ

Златник Е.Ю., Бахтин А.В., Новикова И.А., Селютина О.Н., Туркин И.Н., Лазутин Ю.Н., Айрапетова Т.Г., Пыльцин С.П., Чубарян А.В.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

CORRELATION BETWEEN IMMUNE STATUS AND AMOUNT OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN LUNG CANCER PATIENTS WITH DIFFERENT STAGE AND HISTOGENESIS OF TUMOR

Zlatnik E.Y., Bakhtin A.V., Novikova I.A., Seliutina O.N., Turkin I.N., Lazutin Y.N., Airapetova T.G., Pyltzin S.P., Chubarian A.V.

Rostov Research Institute of Oncology

Взаимодействие между злокачественной опухолью и иммунной системой опухоленосителя может реализоваться в различных вариантах «иммуноредактирования» опухоли. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) считаются в настоящее время одним из важных механизмов метастазирования злокачественных опухолей, но они же могут нести опухолевые антигены и потенциально индуцировать иммунный ответ. К настоящему моменту накоплен ряд данных о роли ЦОК в прогнозе течения некоторых злокачественных опухолей [1], в частности, рака легкого (РЛ). Высокий уровень ЦОК коррелирует со сниженной общей выживаемостью при мелкоклеточном раке легкого (МРЛ); его изменения в динамике лечения, также были прогностически ценными [2,3]. Считается, что определение ЦОК при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) может быть ограничено слабой экспрессией его клетками молекул ЕpСАМ, на обнаружении которых основана система их выявления CellSearch. Ряд исследований доказывает, что частота обнаружения ЦОК при НМРЛ ниже, чем при МРЛ [4,5]. Есть противоречивые сообщения

о связи ЦОК с тяжестью опухолевого процесса при НМРЛ [6,7].

Несмотря на то, что ЦОК играют ключевую роль в метастатическом каскаде, в частности, при РЛ, сведения об их возможном значении в процессе «иммуноредактирования» единичны.

Цель работы. Установить взаимосвязи между иммунным статусом и количеством циркулирующих опухолевых клеток у больных раком лёгкого при различной распространённости и гистогенезе опухоли.

Материалы и методы. Изучали содержание ЦОК и показатели иммунного статуса у больных РЛ; результаты анализировали в зависимости от распространённости (стадии), гистогенеза, количества ЦОК в крови. Обследовано 30 больных: 26 мужчин (86,7%) и 4 женщины (13,3%); средний возраст $62 \pm 1,3$ года. Гистологическим типом у 20 больных (66,7%) был мелкоклеточный РЛ, представляющий собой нейроэндокринную опухоль (МРЛ/НЭО), у 10 больных (33,3%) НМРЛ (аденокарцинома). На момент установления диагноза у 13 больных (43,3%) была III, у 17 (56,7%) – IV стадия заболевания. У 25 больных (83,3%) был

диагностирован центральный РЛ, у 5 (16,7%) – периферический РЛ. Среди пациентов с МРЛ подавляющее большинство составили мужчины – 19 из 20 (95%), в группе с НМРЛ было 3 женщины и 7 мужчин (30% и 70%). Средний возраст в обеих группах был идентичен: $62,2 \pm 1,6$ года и $62,8 \pm 2,2$ года. Распределение по стадиям: в группе МРЛ у 13 больных (65%) была III, у 7 (35%) – IV стадия заболевания; в группе с НМРЛ у всех 10 была диагностирована IV стадия. Среди пациентов с МРЛ у большинства был центральный рак – 18 больных из 20 (90%); в группе НМРЛ у 3 (30%) был периферический, у 7 больных (70%) центральный РЛ.

В крови больных до начала лечения определяли уровень ЦОК по технологии анализа в системе CellSearch System™ (Janssen Diagnostics, LLC) с микрочастицами железа, покрытыми антителами к маркерам адгезии эпителиальных клеток ЕpCAM, CD45 и цитокератинам 8,18,19. Качество работы системы оценивали с использованием стандартного контроля CTC control kit. Материал сканировали в анализаторе CellTracks® Analyzer II°. ЦОК регистрировали с учётом морфологических характеристик и экспрессии маркеров. В крови определяли субпопуляционный состав лимфоцитов на проточном цитометре FACSCantoII (BD): процент Т-В-НК-клеток, Т-reg; CD4+ и CD8+ клеток, экспрессирующих активационные маркеры (CD69+, CD38+, CD25+, HLA-DR+ CD95+); «наивных» Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти (CD45RA-/CD45RO+); среди НК-клеток определяли лимфоциты с различной экспрессией CD16 и CD56, а также экспрессирующие CD335, перфорин, гранзим В.

Статистическую обработку выполняли с использованием параметрических и непараметрических методов. Вычисляли среднюю, медиану, ошибку средней, достоверность различий, а также коэффициент корреляции (r); силу прямых и обратных корреляционных связей по критерию Пирсона.

Результаты. ЦОК были обнаружены у 27 больных (90%) в количестве от 1 до 6888, причем в группе МРЛ ЦОК выявлены у 17 больных (85%) в количестве 0–6888, среднее значение составило 655,7, медиана 38,5; в группе НМРЛ ЦОК найдены у всех 10 пациентов в количестве 1–486, сред-

нее значение составило 57,2, медиана 5,0. Были выделены группы больных РЛ с низким, средним и высоким уровнями ЦОК (<10, 10–100 и >100 в пробе соответственно).

При сравнении показателей уровня ЦОК и иммунного статуса больных РЛ разного гистогенеза, установлено, что отмеченное выраженное преобладание уровня ЦОК при МРЛ, сопровождалось более высоким содержанием CD3+CD4+ клеток с маркерами поздней активации (CD95+), а также CD3+CD4+ клеток с иммунофенотипом клеток «памяти» ($84,4 \pm 2,4$ и $72,2 \pm 3,7\%$; $73,2 \pm 4,1$ и $64,7 \pm 3,5\%$ соответственно, $p < 0,05$). У этих же больных уровень CD3+CD8+HLA-DR+ лимфоцитов был выше, чем у больных НМРЛ ($29,2 \pm 4,2$ и $19,8 \pm 2,2\%$ соответственно, $p < 0,05$). У больных МРЛ обнаружены более низкие показатели индекса CD3+CD4+/CD3+CD8+ ($1,4 \pm 0,1$ и $1,9 \pm 0,3$ соответственно, $p < 0,05$), активированных CD3+CD4+ лимфоцитов, экспрессирующих CD38 ($19,9 \pm 2,3$ и $27,8 \pm 3,5\%$ соответственно, $p < 0,05$), и НК-клеток, способных к продукции интерферона-гамма (CD16dimCD56bright) ($7,1 \pm 1,5$ и $15,3 \pm 3,8\%$ соответственно, $p < 0,05$).

Сравнительная характеристика показателей иммунного статуса у больных РЛ разных стадий показала, что при IV стадии количество ЦОК было выше, чем при III ($713 \pm 448,5$ и $44,6 \pm 18,7$ соответственно, $p < 0,05$), что сопровождается статистически значимыми различиями ряда показателей клеточного иммунитета. Среди основных популяций Т-В-НК-клеток отмечено только более высокое количество В-лимфоцитов у больных IV стадии по сравнению с III ($9,4 \pm 1$ и $6,7 \pm 1,1\%$ соответственно, $p < 0,05$), а большая часть различий выявлена при анализе Т-клеток с иммунофенотипом клеток «памяти» и активированных. Так, при IV стадии отмечен более низкий уровень Т-лимфоцитов «памяти» как среди CD3+CD4+ ($65,9 \pm 3,6$ и $77,6 \pm 4,0\%$ соответственно, $p < 0,05$), так и среди CD3+CD8+ клеток ($36,2 \pm 3,9$ и $43,5 \pm 7,1\%$ соответственно, $p < 0,05$). Кроме того, при IV стадии ниже, чем при III, было содержание активированных CD3+CD4+ и CD3+CD8+ с маркерами как ранней (CD38, CD25), так и поздней (HLA-DR, CD95) активации, а также количество активированных натуральных киллеров (CD335+ и Гранзим В+). При этом у больных с

IV стадией были выше по сравнению с III уровнем TNK-лимфоцитов ($7,4 \pm 1,2$ и $5,1 \pm 0,6\%$ соответственно, $p < 0,05$), CD3+CD4+CD38+ клеток ($26,6 \pm 2,9$ и $17,7 \pm 2,6\%$ соответственно, $p < 0,05$), и «наивных» CD3+CD4+ лимфоцитов ($12,2 \pm 2,5$ и $6,3 \pm 1\%$ соответственно, $p < 0,05$).

При проведении корреляционного анализа выявлен ряд различий коэффициентов корреляции между показателями иммунного статуса больных МРЛ и НМРЛ с уровнем ЦОК. Так, при МРЛ отмечены прямая связь с уровнем ЦОК количества наивных CD4 клеток ($r=0,5$) и обратная – с уровнем CD3+CD4+ клеток памяти ($r=-0,6$) и активированных (CD3+CD4+CD95+) лимфоцитов ($r=-0,7$). Разнонаправленные связи выявлены между уровнем ЦОК и характеристиками функциональной активности NK-лимфоцитов, причем перфорин демонстрирует прямую сильную связь ($r=0,9$), а гранзим В – умеренную обратную ($r=-0,6$). НМРЛ характеризуется прямой связью уровня ЦОК с процентом CD3+, CD3+CD8+ клеток ($r=0,8$) и сильной обратной – с количеством CD3+CD8+ клеток памяти ($r=-0,7$). Показана корреляция уровня ЦОК с количеством активированных CD3+CD4+CD25+ лимфоцитов ($r=0,6$) и CD3+CD4+HLA-DR+ ($r=0,9$), несмотря на обратную корреляцию с общим уровнем CD4+ клеток ($r=-0,7$) и её отсутствие с Tregs. Уровень ЦОК при НМРЛ обратно коррелирует с активностью фагоцитарного звена, включая как нейтрофильный ($r=-0,9$), так и макрофагальный фагоцитоз ($r=-0,5$). Как при МРЛ, так и при НМРЛ уровень ЦОК обратно коррелирует с количеством Т-лимфоцитов памяти, хотя при МРЛ она выявлена с CD4+ ($r=-0,6$), а при НМРЛ – с CD8+ клетками ($r=-0,7$).

Рассмотрение корреляционных связей уровня ЦОК с иммунологическими показателями больных различных стадий позволило установить при III стадии отрицательные связи количества моноцитов ($r=-0,5$), фагоцитирующих гранулоцитов ($r=-0,7$) и активированных CD3+/CD4+/CD38+ ($r=-0,5$). При IV стадии выявлены отрицательные связи уровня ЦОК с процентом фагоцитирующих моноцитов ($r=-0,8$) и положительная – с количеством перфорин-содержащих натуральных киллеров ($r=0,6$).

Заключение. У обследованных больных РЛ

выявляемость ЦОК с применением методики CellSearch® при НМРЛ/аденокарциномах была выше, чем при МРЛ/НЭО. Отмечено выраженное преобладание количества ЦОК при МРЛ по сравнению с НМРЛ и у больных генерализованным РЛ по сравнению с местно-распространенным. Выявлен ряд соответствий уровня ЦОК и показателей иммунного статуса, некоторые подтверждены корреляционным анализом. Как при МРЛ, так и при НМРЛ, различия обнаруживались не в основных субпопуляциях Т, В, НК-клеток и не среди Тregs, а в субпопуляциях активированных Т-лимфоцитов, Т-клеток памяти, функционально активных НК-клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00244мол_а «Оценка взаимного влияния уровня циркулирующих опухолевых клеток и параметров иммунного статуса у больных раком легкого».

ЛИТЕРАТУРА:

1. Кит О.И., Новикова И.А., Бахтин А.В. и соавт. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови // Междунар. журн. экспериментального образования. 2013 - №11-12. - С.37-39.
2. Normanno N., Rossi A., Morabito A., et al. Prognostic value of circulating tumor cells' reduction in patients with extensive small-cell lung cancer // Lung Cancer. — Aug 1, 2014. — 85. — P.314-319.
3. Naito T, Tanaka F, Ono A, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells in patients with small cell lung cancer // J ThoracOncol. — 2012. — 7. — P.512-519.
4. Matthew G. Krebs, Robert Sloane, Lynsey Priest, et al. Blackhall Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer // J ClinOncol. — Apr 20, 2011. — 29(12). — P.1556-1563.
5. Hofman V, Ilie MI, Long E, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method // Int J Cancer. — 2011. — 129. — P.1651-1660.
6. Maheswaran S., Sequist L.V., Nagrath S., et al. Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells // N Engl J Med. 2008 - July 24; 359(4) - P.366-377.
7. Yuh-Pyng Sher, Jin-Yuan Shih, et al. Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Detecting Circulating Cancer Cells in the Peripheral Blood with Multiple Marker Genes // Clin. Canc. Res. 2005. - V. 11.№1. - P.173-179.