

УДК 616.24-006.6-076.5:612.017.1

ДЕТЕКЦИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЕ С ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ У БОЛЬНЫХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМИ ФОРМАМИ РАКА ЛЕГКОГО

Бахтин А.В., Кит О.И., Новикова И.А., Златник Е.Ю., Исаева Р.Г., Селютин О.Н.,
Шульгина О.Г.

ФГБУ "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия (344037, Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, 63), e-mail: rnioi@list.ru

20 больным раком легкого IV стадии с использованием системы CellSearch™ проведено исследование, направленное на обнаружение ЦОК, и определена взаимосвязь их с параметрами иммунного статуса. У больных НМРЛ частота выявления ЦОК составила 91%, при МРЛ 66,7%. При НМРЛ в 80% уровень ЦОК соответствовал низким значениям. Больных НМРЛ с высоким уровнем ЦОК выявлено не было. При МРЛ преобладали больные с высокими значениями ЦОК (66,6 %). Высокий уровень ЦОК характеризовался достоверно более низким относительным содержанием CD3+CD4+ лимфоцитов, в сравнении со значениями больных с низким и средним уровнем ЦОК, а также достоверно высоким содержанием T-reg и CD19+ лимфоцитов в сравнении с показателями больных со средним уровнем ЦОК. Отрицательная корреляционная связь выявлена между уровнями ЦОК и CD3+CD4+ клеток, уровнем ЦОК и ИРИ; положительная корреляционная связь между уровнями ЦОК и CD3+CD8+CD38+ клеток. Уровень ЦОК продемонстрировал корреляционную связь с минорными субпопуляциями лимфоцитов: CD3+CD4+CD25+ и CD3+CD4+CD8+, CD3+CD8+CD25+ и CD3+CD16/56+

Ключевые слова: мелкоклеточный рак легкого (МРЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), иммунокомпетентные клетки.

DETECTION OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN THE BLOOD AND THEIR CORRELATION WITH IMMUNOCOMPETENT CELLS IN PATIENTS WITH GENERALIZED LUNG CANCER

Bakhtin A.V., Kit O.I., Novikova I.A., Zlatnik E.Y., Isaeva R.G., Selyutina O.N.,
Shulgina O.G.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia (344037, Rostov-on-Don, 14 Line, 63), e-mail: rnioi@list.ru

20 patients with stage IV lung cancer were examined using CellSearch™ system in order to detect CTCs and determine their interrelation with immune status parameters. CTC detection in patients with NSCLC was 91% and with SCLC – 66.7%. CTC level corresponded to the low values in 80% in NSCLC. NSCLC patients with a high CTC level were not found. High CTC values prevailed in SCLC patients (66.6%). A high CTC level was characterized by a significantly low relative content of CD3+CD4+ lymphocytes in comparison with the values in patients with a low and average CTC levels, and by significantly high content of T-reg and CD19+ lymphocytes in comparison with the values in patients with an average CTC level. Negative correlation was observed between levels of CTCs and CD3+CD4+ cells and between CTCs and immunoregulatory index; positive correlation - between levels of CTCs and CD3+CD8+CD38+ cells. Level of CTCs was found to have correlation with minor subpopulations of lymphocytes: CD3+CD4+CD25+ and CD3+CD4+CD8+, CD3+CD8+CD25+ and CD3+CD16/56+.

Keywords: small cell lung cancer (SCLC), non-small cell lung cancer (NSCLC), circulating tumor cells (CTCs), immunocompetent cells.

Взаимодействие опухоли и организма опухоленосителя является одной из важнейших фундаментальных проблем онкологии. Очевидно, что, несмотря на многочисленные барьерные и защитные механизмы, включая иммунные, опухоль растет и метастазирует. Среди сложных механизмов этого процесса, имеющих особенности в зависимости от локализации, гистологического строения, пролиферативных характеристик,

иммунофенотипа, молекулярно-биологических и других особенностей опухоли, представляются важными теми, которые действуют на этапе циркуляции опухолевых клеток в крови, где они находятся в окружении иммунокомпетентных клеток.

Детекция ЦОК в крови больных представляет собой вариант «жидкостной биопсии», позволяющей в ранние сроки предсказывать возникновение рецидива заболевания, прогнозировать течение болезни, осуществлять мониторинг эффективности терапии. Количество ЦОК используют как независимый высокоспецифичный прогностический фактор при раке молочной железы [8], простаты [9] и толстой кишки [7]. Обнаружение ЦОК в крови больных раком молочной железы, предстательной железой и толстой кишки может служить не только маркером распространенности опухолевого процесса и оценки эффективности проводимого лечения, но и индикатором активности опухолевого процесса и его стабилизации, даже при наличии дистантных метастазов [3].

Первой системой для непосредственного определения ЦОК в крови пациентов стала система CellSearch™ (Janssen Diagnostics, Inc.), которая утверждена для применения при трёх локализациях злокачественных опухолей: раке молочной железы, простаты и толстой кишки. Поскольку принцип работы системы CellSearch™ связан с наличием на поверхности ЦОК маркеров адгезии эпителиальных клеток ЕpCAM и цитокератинов 8,18,19, можно ожидать успешной детекции всех опухолевых клеток, несущих данные молекулы (гландулярный эпителий пищеварительного, респираторного, урогенитального тракта; эндокринные и экзокринные клетки, мезотелий).

Интерес исследователей к РЛ закономерен: он занимает лидирующее место в смертности от онкологического заболевания по всему миру [10], а пятилетняя выживаемость составляет менее 5 и 15 % для мелкоклеточного (МРЛ) и немелкоклеточного (НМРЛ) рака лёгкого соответственно [6] [5].

В последние годы доказано, что в процессе опухолевого роста нередко развиваются механизмы, обеспечивающие «ускользание» опухолевых клеток от надзора со стороны иммунной системы [2]. Хотя антигены опухолевых клеток и распознаются иммунной системой, элиминация их происходит не всегда, так как механизмы, направленные на уничтожение опухолевых клеток, могут играть противоположную роль, способствуя ее сохранению и прогрессии [1]. Кроме того, опухоль по своему составу гетерогенна, что создает предпосылки для естественного отбора определенных клеточных клонов, наиболее приспособленных к окружающим условиям [4]. Поиск механизмов, влияющих на диссеминацию опухолевых клеток в кровяном русле, важен как для снижения вероятности возможного прогрессирования, так и для определения новых прогностических факторов, а

понимание участников и процессов, вовлеченных в метастазирование, может привести к эффективным, целевым подходам в его лечении и профилактике.

Цель исследования. Оценить частоту выявления ЦОК при генерализованных формах рака легкого, а также их взаимоотношение с иммунокомпетентными клетками крови.

Материалы и методы исследования: Исследование проведено 20 больным раком легкого IV стадией заболевания (T2-3N2-3M1) в возрасте от 52 до 75 лет. У 11 человек (55 %) гистологический тип опухоли соответствовал немелкоклеточному раку, у 9 (45 %) – мелкоклеточному. Анализ образцов крови на наличие ЦОК осуществляли на системе CellSearch с использованием набора реагентов CELLSEARCH® CTC Kit. Число выявленных ЦОК являлось конечным результатом. По количеству ЦОК больные были разделены на группы с низким количеством (до 10) ЦОК, со средним (от 11 до 100) ЦОК, и высоким (свыше 100) ЦОК. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов определяли на проточном цитометре BD FACSCantoII. Протоколы интерпретации данных включали определение основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови, количества Т-регуляторных клеток (CD4+CD25+CD127dim), NKT-клеток, двойных негативных CD3+/CD4-/CD8- (DN) и двойных позитивных CD3+/CD4+/CD8+ (DP) Т-лимфоцитов, количества активационных маркеров (CD25, CD38, CD95, HLADR) на Т-хелперах (CD3+CD4+) и ЦТЛ (CD3+CD8+). Результаты выражали в процентах от общего количества лимфоцитов, а для Т-регуляторных клеток в процентах от CD3+CD4+ клеток. Статистический и корреляционный анализ результатов исследования проводили с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., США), статистически достоверные различия принимали при $p < 0,05$; при коэффициенте корреляции (r) от 0,91 до 1,00 теснота связи определялась как очень сильная, от 0,81 до 0,90 – весьма сильная, от 0,65 до 0,80 – сильная, от 0,45 до 0,64 – умеренная, от 0,25 до 0,44 – слабая, до 0,25 – очень слабая.

Результаты и обсуждение

ЦОК были выявлены у 16 из 20 больных раком легкого (80 %) в количестве от 1 до 980 клеток в 7,5 мл крови, при НМРЛ у 10 из 11 (в 91 %), при МРЛ у 6 из 9 человек (в 66,7 %). Доля больных раком легкого с количеством ЦОК от 1 до 10 клеток составила 50 % (8 из 16 больных), с уровнем ЦОК от 11 до 100 и свыше 100 клеток, по 25 % (4 из 16 больных). При МРЛ количество ЦОК находилось в пределах от 1 до 980, тогда как при НМРЛ от 1 до 13 клеток. Среди больных МРЛ с выявленными ЦОК преобладали те, у кого количество превышало 100 клеток (в 66,6 % случаев, у 4 из 6 больных), тогда как с наименьшим и средним количеством ЦОК их отмечалось по 16,7 % (по 1 из 6 больных для каждой группы). У больных НМРЛ нами выявлена обратная закономерность. В этой группе у 80 % больных (у

8 из 10) уровень ЦОК соответствовал низким и у 20 % (у 2 из 10) средним значениям. Больные с высокими значениями ЦОК среди НМРЛ отсутствовали.

Сравнение показателей клеточного иммунитета у больных РЛ при обнаружении у них различного количества ЦОК показало ряд статистически значимых различий, несмотря на немногочисленность наблюдений. Так, из табл.1 видно, что при высоком уровне ЦОК отмечено достоверно более низкое процентное содержание CD3+CD4+ лимфоцитов по сравнению с показателями больных, у которых ЦОК были обнаружены в количествах до 100. Противоположные различия отмечены для CD3+CD8+CD38+, хотя по общей субпопуляции CD3+CD8+ лимфоцитов они не установлены. Как видно из табл.1, уровень лимфоцитов с иммунофенотипом активированных цитотоксических Т-клеток статистически достоверно (в 2–3 раза) выше у больных с максимальным содержанием ЦОК по сравнению с остальными группами. Обращают на себя внимание более низкие значения ряда показателей у больных со средними значениями уровней ЦОК, однако, статистически достоверные различия выявлены только для В-лимфоцитов, относительное содержание которых в 3 раза ниже, чем в остальных группах, а также для Т-regs, количество которых было в 2 раза ниже, чем у больных с высоким содержанием ЦОК. При этом у больных со средними уровнями ЦОК обнаружено более высокое содержание Т-лимфоцитов обеих основных субпопуляций с маркерами поздней активации CD3+CD4+HLA-DR+ и CD3+CD8+HLA-DR+, которое вследствие значительной индивидуальной вариабельности определялось в виде тенденции. Результаты относительного содержания иммунологических параметров в зависимости от количества выявленных ЦОК представлены в табл.1.

Таблица 1

Показатели иммунного статуса больных раком легкого в исследуемых группах, %

Исследуемые иммунологические параметры	Количество выявленных ЦОК		
	<10 ЦОК	11<ЦОК<100	>100 ЦОК
CD3+	70,94±7,84	81,6±10,89	70,7±15,12
CD3+/CD4+	42,24±4,55	44,7±2,55	28,95±3,75 *↓°↓
T-reg (от CD4)	8,3±3,76	5,2±2,12	10,3±1,13 °↑
CD3+/CD4+/CD38+	33,66±9,95	27,8±22,77	29,1±4,1
CD3+/CD4+/HLA-DR+	7,82±0,7	17,7±5,23	9,95±0,21
CD3+/CD4+/CD25+	5,26±0,71	3,55±1,77	8,05±5,59
CD3+/CD4+/CD95+	71,76±6,41	77,45±23,55	78,45±2,33
CD3+/CD8+	25,28±8,25	32,4±10,32	35,5±14,71
CD3+/CD8+/CD38+	17,1±6,39	11,65±3,04	30,65±2,9 *↑°↑
CD3+/CD8+/HLA-DR+	25,38±10,25	33,3±4,67	21,65±9,83
CD3+/CD8+/CD25+	3,72±1,93	4,2±3,54	5,4±5,8
CD3+/CD8+/CD95+	84,42±5,28	86,3±2,26	86,0±5,37

CD(16+56)+	16,08±9,68	13,5±10,61	16,8±15,27
CD3+/CD(16+56)+	5,58±1,1	5,65±1,2	14,95±10,39
CD19+	11,86±4,46	3,75±0,92 *↓	11,2±1,27 °↑
CD3+/CD4-/CD8-	2,25±1,2	3,65±3,61	3,1±0,85
CD3+/CD4+/CD8+	0,64±0,19	1,5±1,56	2,3±2,83
ИРИ	1,84±0,59	1,5±0,57	0,9±0,28

Примечание.* – разница показателей достоверна по отношению к группе с количеством до 10 ЦОК ($p \leq 0,05$).

° – разница показателей достоверна по отношению к группе с количеством от 11 до 100 ЦОК ($p \leq 0,05$).

При проведении корреляционного анализа наличия в крови больных ЦОК и иммунологическими параметрами выявлена сильная отрицательная корреляционная связь ($r -0,87$) между присутствием в крови ЦОК и CD3+CD4+ клеток. Подобная закономерность наблюдается и для ИРИ ($r -0,53$). Сильная положительная корреляция ($r 0,78$) обнаружена между лимфоцитами с иммунофенотипом активированных цитотоксических Т-клеток и наличием ЦОК. Результаты корреляционного анализа связи иммунологических параметров и наличия ЦОК представлены в табл. 2.

Таблица 2

Корреляционная связь исследуемых иммунологических параметров и ЦОК

Исследуемые иммунологические параметры	ЦОК
CD3+	-0,30
CD3+/CD4+	-0,87
Т-reg (от CD4)	0,39
CD3+/CD4+/CD38+	-0,08
CD3+/CD4+/HLA-DR+	-0,05
CD3+/CD4+/CD25+	0,74
CD3+/CD4+/CD95+	0,20
CD3+/CD8+	0,19
CD3+/CD8+/CD38+	0,78
CD3+/CD8+/HLA-DR+	-0,14
CD3+/CD4+/CD25+	0,45
CD3+/CD4+/CD95+	-0,04
CD(16+56)+	0,24
CD3+/CD(16+56)+	0,49
CD19+	0,10
CD3+/CD4-/CD8-	0,02
CD3+/CD4+/CD8+	0,67
ИРИ	-0,53

Как видно из табл. 2, уровень ЦОК демонстрирует сильную корреляционную связь с некоторыми минорными субпопуляциями лимфоцитов: CD3+CD4+CD25+ ($r 0,74$) и

CD3+CD4+CD8+ (r 0,67), при этом показана умеренная корреляция с CD3+CD8+CD25+ (r 0,45) и CD3+CD16/56+, т.е. NKT (r 0,49). Последнюю можно рассматривать как артефакт, т.к. высокий процент NKT-клеток был, вероятно, компенсаторным при низком уровне NK лимфоцитов и обнаружен только у 1 больного, у которого при этом определялось высокое количество ЦОК.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование с использованием системы CellSearch показало высокую частоту выявления ЦОК у больных раком легкого. У больных НМРЛ в 1,4 раза чаще выявлялись опухолевые клетки в крови, в сравнении с МРЛ, при этом при НМРЛ преобладающим являлся низкий уровень ЦОК, тогда как при МРЛ – высокий. Высокий уровень ЦОК характеризовался достоверно более низким относительным содержанием CD3+CD4+ лимфоцитов, а также достоверно высоким содержанием T-reg и CD19+ лимфоцитов. Количество Tregs клеток, с которыми, по современным представлениям, связана иммунодепрессия и прогрессирование опухоли, не продемонстрировали ни статистически достоверных различий, ни корреляций с наличием ЦОК, однако, выявленная положительная корреляционная связь последнего с долей лимфоцитов, экспрессирующих CD4+CD25+, позволяет предположить участие Tregs в процессе гематогенного метастазирования, тем более, что она выявлена на фоне отрицательной корреляции с общим количеством лимфоцитов Т-хелперно-индукторной субпопуляции (CD3+CD4+). У больных с высокими значениями ЦОК выявленная положительная корреляция уровней DP (CD3+CD4+CD8+) лимфоцитов и ЦОК, по-видимому, связана с увеличением выброса незрелых клеток из тимуса, возможно, компенсаторным. Этим же можно объяснить и повышение уровня CD3+CD8+CD38+ клеток, однако, то обстоятельство, что подобные изменения не распространяются на лимфоциты с фенотипом CD3+CD4+CD38+, говорит о нарушении Т-хелперного звена еще на уровне посттимических предшественников. Полученные нами результаты о повышении содержания клеток этой субпопуляции на фоне высокого уровня ЦОК в целом соответствуют представлениям об их негативной роли при распространенных опухолевых процессах. Несмотря на полученные данные, исследования, направленные на определение уровня ЦОК в сочетании с детальной оценкой иммунного статуса для расширения представлений о механизмах метастазирования, и как следствие, поиска подходов для их профилактики, должны быть продолжены.

Список литературы

1. Абелев Г.И., Эрайзер Т.Л. На пути к пониманию природы рака // Биохимия. – 2008. – Т.73, № 5. – С. 605–618.
2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – 3-е изд., доп. – К.: ООО «Полиграф плюс», 2006. – 482 с.
3. Кит О.И., Новикова И.А., Бахтин А.В. и др. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 11. – С. 37-39.
4. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А. и др. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. – Новосибирск: ЗАО ИПП «Офсет», 2014. – 128 с.
5. Anthony J. Alberg. Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines / J. Alberg Anthony, V. Brock Malcolm, G. Jean et al. // CHEST. – 2013. Vol.5, № 143(Suppl). – P. e1S–e29S.
6. Tognela A. et al. Predictive and prognostic value of circulating tumor cell detection in lungcancer: A clinician's perspective/ Critical Reviews in Oncology / A. Tognela et al. // Hematology. – 2015. – № 93. – P. 90–102.
7. Cohen S.J. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer / S.J.Cohen, C.J. Punt, N. Iannotti et al. // J Clin Oncol. – 2008. – Vol.19, № 26. – P. 3213-21.
8. Cristofanilli M. M.D. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer / M. M.D. Cristofanilli, G.T. Budd, M.J. Ellis et al. // N Engl J Med. – 2004, № 351. – P. 781-91.
9. De Bono J.S. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer / J.S. De Bono, H.I. Sher, R.B. Montgomery et al. // Clin Cancer Res. – 2008, № 14. – P. 6302.
10. Budd G. Thomas. Circulating Tumor Cells versus Imaging - Predicting Overall Survival in Metastatic Breast Cancer / G. Thomas Budd, Massimo Cristofanilli, Mathew J.Ellis et al. // Clin Cancer Res. – 2006. – Vol.21, № 12. – P. 6403.

Рецензенты:

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории изыскания новых противоопухолевых средств ФГБУ «РНИОИ» Минздрава РФ, г. Ростов-на-Дону;

Николаева Н.В., д.м.н., ассистент кафедры онкологии ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава РФ, г. Ростов-на-Дону.