

АНАЛИЗ ИММУННОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ПОСЛЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ОПЕРАТИВНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Колесников В.Е., Кит О.И., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Гранкина А.О., Геворкян Ю.А., Максимов А.Ю.

ФГБУ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: rnioi-patology@yandex.ru

В данной статье приведены результаты оценки клеточных показателей иммунного статуса с использованием метода 6-цветной проточной цитофлюориметрии на анализаторе BD FACSCantoII до операции и через 7 суток после лапароскопического (основная группа) или открытого (контрольная группа) оперативного вмешательства. В исследовании приняли участие 305 больных с метастатическим раком толстой кишки с резектабельными метастазами в печень. В ходе исследования был отмечен ряд изменений исследованных параметров в динамике оценки иммунного статуса после лапароскопических операций. Полученные результаты свидетельствуют о большей сохранности Т-, В- и NK-клеточного звеньев, обеспечивающих различные иммунные реакции организма, в т. ч. противоопухолевые, хотя, учитывая ранние сроки исследования после операции, описанные различия могут быть транзиторными. Исследование показало, что проведение лапароскопических операций больным генерализованным колоректальным раком оказывает более щадящее действие на основные звенья иммунной системы, по сравнению с традиционными открытыми операциями.

Ключевые слова: колоректальный рак, проточная цитофлюориметрия, лапароскопические и открытые операции.

ANALYSIS OF IMMUNE STATUS OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER AFTER DIFFERENT OPTIONS OF SURGICAL INTERVENTION

Kolesnikov V.E., Kit O.I., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Grankina A.O., Gevorkyan Yu.A., Maksimov A.Yu.

Rostov-on-Don, research institute of oncology, Rostov-on-Don, e-mail: rnioi-patology@yandex.ru

This article presents the results of the evaluation of cellular immune status indicators using method 6-color flow cytometry analyzer BD FACSCanto II before and 7 days after laparoscopic (study group) or open (the control group) surgery. The study involved 305 patients with metastatic colon cancer with resectable liver metastases. The study identified a number of changes in the studied parameters in the assessment of the dynamics of immune status after laparoscopic surgery. The results indicate greater safety T-, B- and NK-cell links providing various immune reactions of the organism, including antineoplastic, although given the early period after surgery studies described differences can be transient. Research has shown that carrying out laparoscopic surgery patients with generalized colorectal cancer has a more gentle action on the main elements of the immune system, compared with traditional open surgery.

Keywords: colorectal cancer, flow cytometry, laparoscopic and open surgery.

В настоящее время при лечении колоректального рака прибегают к хирургическим вмешательствам. Сочетание злокачественного новообразования и хирургической травмы приводит к снижению адаптивных и функциональных возможностей организма больных с вызванной иммуносупрессией, что может привести к развитию послеоперационных осложнений и ухудшению прогноза [7].

У больных с онкологическими заболеваниями отмечаются нарушения различных звеньев иммунитета, играя важную роль в течение основного заболевания [4, 5, 6]. Вместе с тем ослабление противоопухолевого иммунологического контроля является одной из существенных составляющих канцерогенеза. Таким образом, ингибирование иммунной

системы у прооперированных пациентов с онкологическими заболеваниями может влиять на частоту послеоперационных осложнений и дальнейшее течение заболевания. В настоящее время, помимо разработки различных иммуномодуляторов [11], совершенствуются методы хирургических подходов, позволяющих проводить более щадящие для гомеостатических систем организма операции, не теряя при этом радикальности. Несмотря на необходимость проведения при злокачественном росте обширных полостных операций, в некоторых случаях представляются возможными малоинвазивные лапароскопические вмешательства.

В последнее время для оценки иммунного статуса онкологических больных помимо стандартного набора лимфоцитарных субпопуляций используют расширенную панель, включающую лимфоциты с маркерами активации, памяти, функциональной активности и позволяющую получить более полную характеристику клеточного звена противоопухолевого иммунитета. В своей работе Абакушина Е.В. и соавт. (2015) утверждает, что изучение закономерностей функционирования механизмов активации и фенотипических маркеров субпопуляций лимфоцитов в организме опухоленосителей позволит дополнить представление о роли иммунной системы в канцерогенезе [1]. Другие авторы говорят о негативном воздействии на противоопухолевый иммунитет регуляторных Т-клеток (Treg), способных угнетать все звенья иммунной системы, повышение уровня и активности которых способствует опухолевой прогрессии [3, 12]. Помимо этого, в ряде работ в качестве прогностического фактора рассматриваются различные субпопуляции лимфоцитов, включая минорные [1, 10].

В нашей работе проводилось одноэтапное удаление опухоли толстой кишки и ее метастазов в печень, способствуя уменьшению травматического воздействия, а, следовательно, стресса и медикаментозной нагрузки, а также более гладкому протеканию послеоперационного периода.

Цель исследования

Сравнить динамику клеточных факторов иммунитета у больных колоректальным раком, прооперированных с применением лапароскопического и открытого подхода.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 305 больных с метастатическим раком толстой кишки с резектабельными метастазами в печень. Все пациенты были разделены на 2 группы: основную (167 человек), в которой проводились лапароскопические операции, и контрольную с проведением традиционных открытых хирургических вмешательств (138 человек).

Для оценки иммунного статуса больных забор крови проводили до оперативного вмешательства при поступлении и перед выпиской из локтевой вены в объеме 5 мл в раствор

полиглюкина с гепарином. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови выполняли методом 6-цветной проточной цитофлюориметрии на анализаторе BD FACSCantoII с панелью антител TBNK (CD3,CD4,CD8,CD16/56,CD19), клеток памяти (CD3,CD4,RA,RO), наивных клеток (CD3,CD4,RA,CD62L), Т-хелперно-индукторных клеток (CD3,CD4,CD38,HLADR), активированных Т-клеток (CD3,CD4,CD8,CD69), Т-регуляторных клеток (CD3,CD4,CD25,CD127), протеолитическая активность Т-цитотоксических клеток (CD3,CD19,CD16/56,GrB,PerF,CD45) производства фирмы Becton Dickinson. Количественное содержание лимфоцитов выражали в процентах.

Результаты исследования и их обсуждение

На всем протяжении исследования, у больных, прооперированных с помощью открытого доступа, наблюдалось статистически значимое снижение абсолютного уровня лимфоцитов как по сравнению с исходными данными, так и по сравнению с результатами больных основной группы (Таблица 1).

Таблица 1

Динамика процентного содержания лимфоцитов и показатели фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов у больных основной и контрольной групп, %

Показатель	Лапароскопические операции, %		Открытые операции, %	
	До операции	После операции	До операции	После операции
Лимфоциты	15,1±2,5	17,6±2,2	22,7±3,4	14,1±2,2*
Гранулоциты	79,7±8,1	72,6±6,6	71,4±7,7	81,3±8,0
Фагоцитоз гранулоцитарный	93,0±9,9	89,2±9,0	92,7±8,8	92,5±6,9
Моноциты	5,33±0,92	6,17±2,05	5,48±1,57	4,75±0,87
Фагоцитоз моноцитарный	84,3±4,6	92,4±5,1	87,5±6,7	79,2±8,2

Примечание – * статистически достоверные отличия от показателя до операции (p<0,05).

После проведения лапароскопических операций процентное содержание CD3+ и DN-лимфоцитов Т-ряда статистически достоверно снижалось. Одновременно статистически значимо возрастали процентные уровни В-клеток, CD4+ и DP Т-лимфоцитов. Содержание Tregs не менялось. У больных контрольной группы отмечалось статистически достоверное снижение процентного содержания CD3+ и CD19+ клеток. Кроме того, в динамике наблюдалось уменьшение содержания основных Т-клеточных субпопуляций (Таблица 2).

Таблица 2

Динамика показателей основных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов после проведения лапароскопических и открытых операций, %

Показатель	Лапароскопические операции, %		Открытые операции, %	
	До операции	После операции	До операции	После операции
CD3+	74,3±5,1	58,8±5,0*	76,5±4,4	64,2±3,3*
CD3+CD4+	30,5±2,1	36,7±2,3*	36,8±3,5	39±3,1
CD3+CD8+	24,7±2,3	27,5±2,5	31,5±3,3	32,9±2,5
CD19+	9,25±1,1	14,8±0,9*	10,5±1,0	7,9±0,8*
DN (CD3+CD4-CD8-)	2,88±0,4	1,8±0,3*	3,3±0,4	3,1±0,3
DP (CD3+CD4+CD8+)	0,7±0,1	1,5±0,3*	1,1±0,28	1,32±0,24
Tregs (CD4+CD25highCD127dim)	7,6±1,3	6,5±1,1	7,325±1,9	10,1±2,1

Примечание – * – статистически достоверные отличия от показателя до операции (p<0,05).

Между тем у больных основной группы происходило снижение процентного содержания НК-лимфоцитов (CD16/56+). Наблюдалось статистически достоверное повышение процентного уровня активированных НК-клеток (CD335) и НКТ-клеток, экспрессирующих маркеры как натуральных киллеров, так и Т-лимфоцитов (CD3+CD16/56+). В контрольной группе отмечалось снижение процентного содержания НК-лимфоцитов (CD16/56+), в том числе содержащих важнейшую протеазу, обеспечивающую их цитотоксичность – Granzyme B, а также абсолютного уровня НКТ-лимфоцитов, что в целом характеризует угнетение НК-клеточного звена после проведения открытых операций (Таблица 3).

Таблица 3

Динамика показателей НК-лимфоцитов после проведения лапароскопических и открытых операций, %

Показатель	Лапароскопические операции, %		Открытые операции, %	
	До операции	После операции	До операции	После операции
CD16/56+	22,2±3,4	13,1±2,6*	20,6±3,0	13,2±2,1*
НКТ (CD3+CD16/56+)	7,9±0,8	11,5±1,2*	10,1±0,8	9,1±1,1
CD335	56,1±4,2	69,8±3,9*	62,6±4,5	64,5±4,3
Granzyme B	55,8±3,7	52±4,3	69,5±4,6	56,2±4,8*

Примечание – * – статистически достоверные отличия от показателя до операции ($p < 0,05$).

Анализ динамики количества лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации, продемонстрировал снижение процента Т-хелперно-индукторных клеток с маркером ранней (CD3+CD4+CD69+) и поздней (CD3+CD4+HLADR+) активации. У больных обеих групп отмечалось статистически значимое возрастание уровня активированных (CD3+CD8+CD38+) лимфоцитов. В отличие от открытых операций, проведение лапароскопических вмешательств повышало процентный уровень CD3+CD4+CD25+ и CD3+CD8+CD25+ лимфоцитов. После лапароскопических операций происходило увеличение количества CD8+ Т-клеток с иммунофенотипом «наивных». Проведения открытых операций ингибировало этот показатель, а также процентное содержание CD4+ лимфоцитов с фенотипом Т-клеток памяти.

Через 7 суток после операции снижался уровень CD3+ лимфоцитов на фоне возрастания обеих основных субпопуляций Т-клеток (CD3+CD4+ и CD3+CD8+). По всей видимости, такие изменения достигаются за счет значительного снижения процента DN Т-клеток, не экспрессирующих ни CD4, ни CD8. Наши исследования показали, что уменьшение количества таких клеток более существенно после лапароскопической операции; при этом у тех же больных происходит возрастание DP Т-лимфоцитов (CD3+CD4+CD8+), характеризующихся как незрелые Т-клетки с фенотипом, присущим поздним тимоцитам. К настоящему времени установлено, что CD4+CD8+ клетки в периферической крови являются высокодифференцированными клетками памяти [10]. Имеются сведения о повышении содержания дубль-позитивных Т-лимфоцитов при длительной антигенной стимуляции, при персистирующей патологии, в частности, при рассеянном склерозе, инфекционных заболеваниях, миастении и др., а также в старческом возрасте [2, 8]. Основываясь на работе Н.В. Балацкой и соавт. (2015), эта субпопуляция клеток, возрастающая при мононуклеозе, вызванном вирусом Эпштейна – Барр, ВИЧ-инфекции, рассматривается в аспекте противоинфекционной защиты [2, 13].

По нашим данным, в обеих группах после операции наблюдалось снижение уровней CD69+, особенно среди субпопуляции CD3+CD4+ клеток. В отличие от CD69+ Т-лимфоцитов, уровень Т-клеток с рецептором CD38 после операции повышался, особенно среди субпопуляции CD3+CD8+. Полученное нами повышение процента CD3+CD8+CD38+ клеток у больных в динамике можно рассматривать как признак активации клеточных иммунных реакций, играющих важную роль в противоопухолевой защите.

После лапароскопической операции отмечалось возрастание уровня CD3+CD4+CD25+ и CD3+CD8+CD25+ клеток, что, на наш взгляд, является свидетельством активации Т-

клеточного звена у больных основной группы.

Снижение уровня CD4+HLA-DR+ у больных обеих групп, по-видимому, свидетельствует о преобладании процессов ранней активации T(CD4+)-лимфоцитов над поздней, тогда как количество CD8+HLA-DR+ лимфоцитов не отличалось ни в динамике, ни между группами. В послеоперационном периоде у больных контрольной группы уменьшался уровень CD4+ T-лимфоцитов с фенотипом клеток памяти (CD3+CD4+CD45RO+CD45RA-), что при дальнейшем сохранении такой тенденции может оказаться неблагоприятным фактором. Полученное нами у больных основной группы повышение содержания CD8+ клеток с фенотипом «наивных» ассоциируется со стимуляцией цитотоксического T-клеточного звена иммунной системы после лапароскопических операций [9].

При вмешательствах на богатых бактериальной микрофлорой органах особенно важно обнаруженное нами увеличение содержания B(CD19+)-лимфоцитов после лапароскопической операции, что может являться фактором положительного прогноза раннего послеоперационного периода, поскольку B-клеточный иммунитет во многом обеспечивает противoinфекционную защиту.

Итак, на основании проведенных исследований показателей иммунного статуса в динамике послеоперационного периода у больных генерализованным колоректальным раком после открытых и лапароскопических операций установлено более щадящее действие последних на основные звенья иммунной системы.

Заключение

В ходе исследования был отмечен ряд изменений изученных параметров в динамике оценки иммунного статуса после лапароскопических операций. Установлено статистически достоверное снижение процентного содержания CD3+, CD16/56+, DN и активированных CD4+клеток с маркерами наиболее ранней (CD69) и поздней (HLA-DR) активации. Также возрастают процентные уровни CD4+, в т.ч. экспрессирующие активационный маркер CD25+ лимфоцитов, однако, это не сопровождается повышением процента лимфоцитов с иммунофенотипом Tregs (CD4+CD25highCD127dim). Кроме того, наблюдается увеличение процента DP, наивных и активированных CD8+ клеток, а также B-лимфоцитов. Полученные данные в целом свидетельствуют о сохранности основных звеньев иммунной системы. Даже при наличии снижения процентного содержания NK-клеток, уровень NKT, а также активированных натуральных киллеров (CD335) повышается, по-видимому, компенсаторно, что говорит о сохранности функциональных резервов данного звена. Абсолютные показатели клеточного иммунитета демонстрируют подобную динамику, часть из которых возрастает у больных после лапароскопической операции (CD3+CD4+, DP), в отличие от больных после открытых операций, у которых происходит снижение абсолютного

содержания CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD16/56+, в т.ч. гранзим-содержащих, а также НКТ. Полученные результаты свидетельствуют о большей сохранности Т-, В- и НК-клеточного звеньев, обеспечивающих различные иммунные реакции организма, в т.ч. противоопухолевые, хотя, учитывая ранние сроки исследования после операции, описанные различия могут быть транзиторными.

Список литературы

1. Абакушина Е.В. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных при комбинированном лечении с включением адоптивной иммунотерапии /Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, И.А. Пасова, Н.В. Селиванова // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № 1. – С. 46-50.
2. Балацкая Н.В. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией / Н.В. Балацкая, Е.А. Еремеева, О.С. Слепова, М.В. Рябина, И.Г. Куликова, Е.С. Сорожкина // Мед. иммунология. – 2015. – Т.17. – № 5. – С. 461-466.
3. Жулай Г.А. Регуляторные Т-клетки и канцерогенез /Г.А. Жулай, Е.К. Олейник // Иммунология. – 2013. – № 1. – С. 61–64.
4. Златник Е.Ю. Цитокиновый состав ткани полипов толстой кишки /Е.Ю. Златник, Е.А. Никипелова, А.Л. Терпугов, А.Ю. Максимов, О.Н. Селютина, Г.А. Загора // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 5-5. – С. 1016-1020.
5. Кит О.И., Златник Е.Ю., Никипелова Е.А., Геворкян Ю.А., Аверкин М.А., Новикова И.А., Дашков А.В. Особенности общего и локального иммунитета при одиночном и синхронном первично-множественном раке толстой кишки // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=7061>.
6. Кит О.И. Местный клеточный иммунитет при аденокарциноме и полипах толстой кишки /О.И. Кит, А.В. Шапошников, Е.Ю. Златник, Е.А. Никипелова, И.А. Новикова // Сибирское мед. обозрение. – 2012. – Т. 76. – № 4. – С. 11–16.
7. Попов К.В. Патогенетическое обоснование выбора комбинированной анестезии при обширных операциях в хирургии колоректального рака: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – 2005. – 25 с.
8. Самотыя Е. Двойные негативные (ДН) и двойные позитивные (ДП) Т-лимфоциты при раке и неопухолевых заболеваниях // Онкологический журнал. – 2011. – Т. 5. – № 3 (19). – С. 145-146.

9. Селедцов В.И. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти /В.И. Селедцов, Л.С. Литвинова, А.Г. Гончаров и соавт. // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т.9. – № 4. – С. 9-15.
10. Хайдуков С.В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, А.А. Тотолян, В.А. Черешнев // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11. – № 2–3. – С. 227–238.
11. Черноусов А.Ф. Иммунодефицит в хирургической гастроэнтерологии / А.Ф. Черноусов, Т.В. Хоробрых, Ф.П. Ветшев // Вестник хирургической гастроэнтерологии. – 2008. – № 2. – С. 40-46.
12. Chen W. / Dendritic cells and (CD4+) CD25+ T regulatory cells: crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance // Front. Biosci.– 2006. – Vol.11. – pp. 1360–1370.
13. Nascimbeni M. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions / Nascimbeni M., Shin E.C., Chiriboga L., Kleiner D.E., Rehermann B. // Blood. – 2004. – Vol. 104. – No. 2. – pp. 478-486.