

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА И КОЛИЧЕСТВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ МЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ И НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО ПРИ РАЗЛИЧНОЙ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ И ГИСТОГЕНЕЗЕ ОПУХОЛЕЙ

Златник Е.Ю.¹, Бахтин А.В.¹, Новикова И.А.¹, Селютина О.Н.¹, Шульгина О.Г.¹, Золотарева Е.И.¹, Черникова Е.Н.¹, Бакулина С.М.¹, Исаева Р.Г.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: rnoi@list.ru

Изучали уровни циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с помощью системы CellSearch® и показатели клеточного иммунитета у 30 больных раком легкого при различном гистогенезе (мелкоклеточный и немелкоклеточный - аденокарцинома) и стадии (III и IV) до начала лечения. Установлена более частая встречаемость ЦОК при НМРЛ, хотя и их более высокое содержание при МРЛ по сравнению с аденокарциномой, а также при IV стадии по сравнению с III. Наличие ЦОК у больных МРЛ сопровождается более низким уровнем активированных Т-лимфоцитов в субпопуляциях CD4+ и CD8+ и активированных натуральных киллеров, т.е. депрессией Т- и NK-звеньев иммунной системы. Как при МРЛ, так и при аденокарциноме уровень ЦОК обратно коррелирует с количеством Т-лимфоцитов памяти, хотя при МРЛ она выявлена с CD4+, а при аденокарциноме – с CD8+ клетками. Заключение: при МРЛ и НМРЛ выявлен ряд корреляций уровней ЦОК с показателями иммунного статуса преимущественно минорными лимфоцитарными субпопуляциями: активированными Т-лимфоцитами, Т-клетками памяти, функционально активными NK-клетками.

Ключевые слова: рак легкого, циркулирующие опухолевые клетки, иммунный статус.

CELLULAR IMMUNITY AND CIRCULATING TUMOR CELLS' LEVELS IN PATIENTS WITH LUNG CANCER OF DIFFERENT STAGE AND HISTOGENESIS

Zlatnik E.Y., Bakhtin A.V., Novikova I.A., Seliutina O.N., Shulgina O.G., Zolotareva E.I., Chernikova E.N., Bakulina S.M., Isaeva R.G.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: rnoi@list.ru

Levels of circulating tumor cells (CTC) were studied using CellSearch® System in 30 patients with lung small-cell and non-small-cell cancer (adenocarcinoma) cancer of III and IV stage before treatment. We found that in lung adenocarcinoma the incidence of CTC was higher, though their levels were more significant in small-cell lung cancer, and in IV stage compared to III one. Presence of CTC in small-cell lung cancer patients is associated with lower level of activated T-lymphocytes in both CD4+ and CD8+ subsets as well as of activated NK-cells, i.e. is characterized by depression of T- and NK-links of immune system. Both in small-cell lung cancer and in adenocarcinoma CTC levels strongly negatively correlated with memory T-cells' amount though in small-cell lung cancer correlation was observed with CD4+ and in adenocarcinoma with CD8+ T-lymphocytes of «memory» phenotype. Conclusion: Some correlations between CTC levels and amounts of minor lymphocytes' subsets: activated T- and NK- lymphocytes, memory T-cells were revealed.

Keywords: lung cancer, circulating tumor cells, immune status.

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 времени накоплен ряд данных о роли ЦОК в прогнозе течения некоторых злокачественных опухолей [2], в частности, он оказался возможным и при раке легкого (РЛ). Так, высокий уровень ЦОК коррелирует со сниженной общей выживаемостью при мелкоклеточном раке

легкого (МРЛ); его изменения в динамике лечения также были прогностически ценными [6; 7]. Считается, что определение ЦОК при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) может быть ограничено слабой экспрессией его клетками молекул ЕpСAM, на обнаружении которых основана система их выявления CellSearch. Ряд исследований доказывает, что частота обнаружения ЦОК при НМРЛ ниже, чем при МРЛ [3; 5]. Есть противоречивые сообщения о связи ЦОК с тяжестью опухолевого процесса при НМРЛ [4; 8]. Несмотря на то что ЦОК играют ключевую роль в метастатическом каскаде, в частности при РЛ, сведения об их возможном значении в процессе «иммуноредактирования» единичны. Между тем эти характеристики, как и особенности гистологического и молекулярного анализа [1], могут быть значимыми для уточнения прогноза и оптимизации лечения больных.

Цель исследования: изучить взаимосвязи между характеристиками клеточного иммунитета и количеством циркулирующих опухолевых клеток у больных мелкоклеточным и немелкоклеточным раком легкого при различной распространенности опухолей.

Материалы и методы исследования: изучали содержание ЦОК и показатели иммунного статуса у больных РЛ. Результаты анализировали в зависимости от распространенности (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: $62,2 \pm 1,6$ 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 ЕpСAM, CD45 и цитокератинам 8,18,19. Качество работы оценивали с использованием стандартного контроля CTC control kit. Материал сканировали в анализаторе CellTracks® Analyzer II®. ЦОК регистрировали с учетом морфологических характеристик и экспрессии маркеров. Результаты выражали в абсолютном количестве ЦОК на 7,5 мл крови (объем пробы). В

крови определяли субпопуляционный состав лимфоцитов на проточном цитометре FACSCantoII (BD): процент Т-В-NK-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 NK-клеток определяли лимфоциты с различной экспрессией CD16 и CD56, а также экспрессирующие CD335, перфорин, гранзим В.

Статистический анализ результатов проводили с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., США) и пакета программ MicrosoftExcel (Windows XP): вычисляли среднюю, медиану, ошибку средней, достоверность различий (по критерию Стьюдента). Данные таблицы при сравнении по стадиям МРЛ представлены в виде $M \pm m$, а для оценки показателей иммунного статуса у больных МРЛ с различным уровнем ЦОК, ввиду малого количества данных, был применен непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Корреляционный анализ результатов исследования проводили с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., США): использовали вычисление коэффициента корреляции (r), силу прямых и обратных корреляционных связей по Пирсону.

Результаты исследования: результаты представлены на рис. 1, 2 и в таблице. ЦОК были обнаружены у 27 больных (90%) в количестве от 1 до 6888, причем, как видно из рис. 1 А, Б, 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, среднее значение составило 57,2, медиана 5,0.

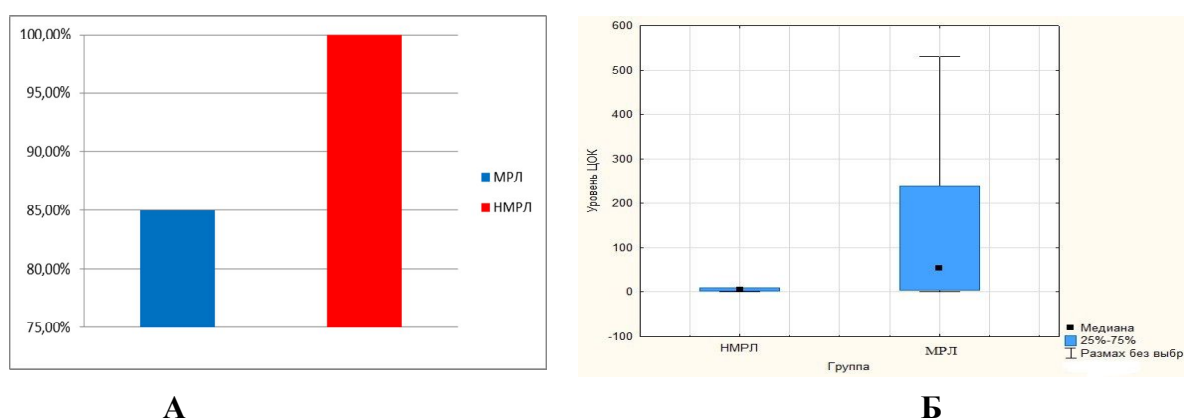


Рис. 1. Частота встречаемости (А) и уровни ЦОК (Б) у больных МРЛ и НМРЛ

При сравнении показателей иммунного статуса ЦОК+ больных РЛ разного гистогенеза установлено (рис. 2), 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±2,4 и 72,2±3,7%; 73,2±4,1 и 64,7±3,5% соответственно, p<0,05). У этих же больных уровень CD3+CD8+HLA-DR+ лимфоцитов был выше, чем у больных НМРЛ (29,2±4,2 и 19,8±2,2% соответственно, p<0,05). У больных МРЛ обнаружены более низкие показатели индекса CD3+CD4+/CD3+CD8+ (1,4±0,1 и 1,9±0,3 соответственно, p<0,05), активированных CD3+CD4+ лимфоцитов, экспрессирующих CD38 (19,9±2,3 и 27,8±3,5% соответственно, p<0,05), и NK-клеток, способных к продукции интерферона-гамма (CD16dimCD56bright) (7,1±1,5 и 15,3±3,8% соответственно, p<0,05).

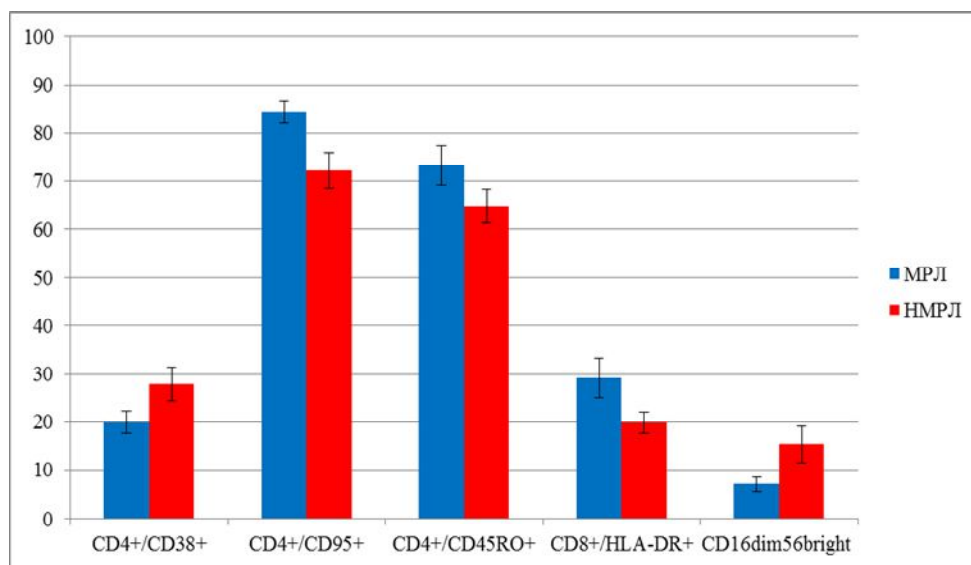


Рис. 2. Некоторые показатели иммунного статуса у больных МРЛ и НМРЛ (%)

При разделении больных с опухолями МРЛ/НЭО в зависимости от стадии был обнаружен более низкий уровень ЦОК при III стадии по сравнению с IV (таблица).

Сравнительная характеристика показателей иммунного статуса у больных МРЛ с различной распространенностью и уровнем ЦОК

Показатели, %	Стадии		Наличие ЦОК	
	III	IV	U-критерий	2-стороннее точное p
ЦОК	44,6±18,7	1616±952,7*		-
Лимфоциты	20,2±1,6	22,6±1,9	21,5	0,689
Моноциты	6,6±0,4	6,2±0,8	16,0	0,358
Гранулоциты	72,2±1,6	70±2,6	25,0	1,000
CD3+	70,3±2,8	72,4±3,6	22,5	0,765
CD3+CD4+	36±1,9	37,5±2,9	14,0	0,258

T-reg (от CD4)	7,6±1	9,5±1,5	17,5	0,416
CD3+CD4+CD45RA-CD45RO+	77,6±4	65,9±8,2	23,5	0,842
CD3+CD4+CD45RA+CD62L+	11±1,9	12,4±3,5	11,5	0,146
CD3+CD4+CD38+	17,7±2,6	23,4±4,4	2,0**	0,007
CD3+CD4+HLA-DR+	15,6±2,7	8,4±1*	14,0	0,258
CD3+CD4+CD25+	23±4,7	13,6±4,5*	25,0	1,000
CD3+CD4+CD95+	89,8±1,9	75,8±3,5*	22,0	0,765
CD3+CD4+CD69+	7,9±1,5	6,2±1,9	24,5	0,921
CD3+CD8+	30,6±3,1	29,9±3,5	22,5	0,765
CD3+CD8+CD45RA-CD45RO+	43,5±7,1	34±8	23,5	0,842
CD3+CD8+CD45RA+CD62L+	6,3±1	12,7±5,6	4,0**	0,019
CD3+CD8+CD38+	31,3±8,1	17,5±4*	13,0	0,216
CD3+CD8+HLA-DR+	34,4±6,1	20,8±3,6*	3,0**	0,012
CD3+CD8+CD25+	5,6±1,5	4,7±1,1	25,0	1,000
CD3+CD8+CD95+	85,9±2,5	84,7±2,6	24,0	0,921
CD3+CD8+CD69+	4,9±1,4	4,3±1,3	22,5	0,765
CD16/56+	21,3±2,5	17,3±3,5	16,0	0,358
CD3+CD16/56+	5,1±0,6	9,7±2,4*	17,5	0,416
CD16dim56bright (от NK)	6,8±2	7,8±2,3	19,5	0,634
CD16bright56dim (от NK)	92,1±1,7	89,8±3,3	15,5	0,359
Granzyme B (от NK)	85,1±1,9	65,2±10*	22,5	0,765
CD335+ (от NK)	40,3±6,6	30,2±7,6	23,5	0,842
CD19+	6,7±1,1	9,5±1,1*	15,0	0,305
DN (CD3+CD4-CD8-)	2,9±0,4	3,4±0,8	11,5	0,146
DP (CD3+CD4+CD8+)	0,6±0,2	1,1±0,6	22,5	0,765
% фагоцитирующих гранулоцитов	93,5±2,4	97,2±1,2	18,5	0,479
% фагоцитирующих моноцитов	83,9±3,7	80,3±5,2	22,0	0,765
CD3+CD4+/CD3+CD8+	1,4±0,2	1,4±0,2	19,5	0,546

Примечание: * - статистически достоверные различия между показателями III и IV стадий;

** - статистически достоверные различия в зависимости от наличия ЦОК (p<0,05).

Как видно из таблицы, при IV стадии МРЛ количество ЦОК было выше, чем при III, что сопровождается статистически значимыми различиями ряда показателей клеточного иммунитета. Отмечено более высокое количество НКТ- и В-лимфоцитов у больных IV стадии по сравнению с III стадией, наряду с более низким уровнем активированных Т-лимфоцитов как среди CD3+CD4+, так и среди CD3+CD8+ клеток, а также с маркерами ранней (CD38, CD25) и поздней (CD95, HLA-DR) активации. Кроме того, при IV стадии ниже, чем при III, было количество активированных натуральных киллеров, экспрессирующих Granzyme B.

Анализ выборки пациентов с наличием и отсутствием ЦОК у больных с МРЛ выявил достоверные различия по уровням активированных Т-лимфоцитов обеих основных субпопуляций (CD4+CD38+, CD8+HLA-DR), которые были ниже при наличии ЦОК; при этом уровень CD3+CD8+ лимфоцитов с фенотипом «наивных» клеток (CD8+CD45RA+CD62L+) у больных с ЦОК оказался выше.

Результаты корреляционного анализа позволили выявить 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 НК-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 ее 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 местнораспространенным. 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 Т-regs, 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».

Список литературы

1. Владимирова Л.Ю. Роль гистологического и молекулярного анализа в выборе метода лечения немелкоклеточного рака легкого поздних стадий / Л.Ю. Владимирова, О.И. Кит, Е.А. Шолохова // Фарматека. - 2012. - № 8 (241). - С. 9-22.
2. Кит О.И. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови / О.И. Кит, И.А. Новикова, А.В. Бахтин и соавт. // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. - № 11-12. - С. 37-39.
3. Hofman V. 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 / V. Hofman, M.I. Ilie, E. Long et al. // Int J Cancer. - 2011. - № 129. - P. 1651-1660.
4. Maheswaran S. Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells / S. Maheswaran, L.V. Sequist, S. Nagrath et al. // N Engl J Med. – 2008. - July 24. - № 359 (4). - P. 366–377.
5. Matthew G.K. Blackhall Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer / G.K. Matthew, S. Robert, P. Lynsey et al. // J ClinOncol. - 2011. - Apr 20. - № 29 (12). - P. 1556-1563.
6. Naito T. Prognostic impact of circulating tumor cells in patients with small cell lung cancer / T. Naito, F. Tanaka, A. Ono et al. // J ThoracOncol. - 2012. - № 7. - P. 512–519.
7. Normanno N. Prognostic value of circulating tumor cells' reduction in patients with extensive small-cell lung cancer / N. Normanno, A. Rossi, A. Morabito et al. // Lung Cancer. - 2014. - Aug 1. - № 85. - P. 314-319.

8. Yuh-Pyng S. Prognosis of Non–Small Cell Lung Cancer Patients by Detecting Circulating Cancer Cells in the Peripheral Blood with Multiple Marker Genes / S. Yuh-Pyng, S. Jin-Yuan et al. // Clin. Canc. Res. - 2005. - V. 11. - № 1. - P. 173-179.