

КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Ситковская А.О.¹, Новикова И.А.¹, Златник Е.Ю.¹, Ульянова Е.П.¹, Шульгина О.Г.¹, Колесников В.Е.¹, Габричидзе П.Н.¹, Донцов В.А.¹, Мезенцев С.С.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: grankina.anastasia@mail.ru

Проведен корреляционный анализ показателей локального противоопухолевого иммунитета и маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и количества циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) у первичных больных с II–IV стадией колоректального рака (КРР). В исследовании принимали участие 60 первичных больных. Все пациенты подписывали информированное согласие. Перед операцией выполняли детекцию ЦОК в системе CellSearchSystem™ (Janssen Diagnostics, LLC). ЦОК \leq 3 считали негативными (ЦОК⁻), ЦОК $>$ 3 – позитивными (ЦОК⁺). Послеоперационный опухолевый материал исследовали ИГХ-методом на наличие опухолевой инфильтрации клетками иммунной системы с применением моноклональных антител к человеческому CD3, CD4, CD8, CD20 и CD56 и экспрессии белков эпителиально-мезенхимального перехода (E-cad, N-cad). В результате было показано, что при нарастании распространенности у ЦОК-больных теряется связь локальных уровней CD4⁺ и CD8⁺, а при IV стадии – и между CD3⁺ и CD4⁺. С III стадии отмечается отрицательная корреляция между экспрессией E- и N-cad, не зависящая от исследованных показателей клеточного локального иммунитета. Вероятно, наличие ЦОК при всех 3 исследованных стадиях КРР вызывает потерю многих связей между показателями T-, B- и НК-звена клеточного локального иммунитета. Если при ЦОК⁻ выявлены отрицательные корреляции между показателями T-, B- и НК-клеток, то при ЦОК⁺ их количество сократилось до 1. Положительная корреляция между локальными уровнями CD3⁺ и CD8⁺ свидетельствует о преобладании цитотоксических T-клеток в опухоли, она выявлена при всех стадиях у ЦОК-больных и теряет достоверность при ЦОК⁺. При II стадии отмечена обратная корреляция между CD4⁺ и экспрессией E-cad, что, возможно, отражает наличие среди этих клеток иммуносупрессивной и ростостимулирующей фракции T-регуляторных клеток. В целом наличие ЦОК оказалось более значимым для количества и характера взаимосвязей клеточных показателей локального иммунитета, чем стадия заболевания.

Ключевые слова: колоректальный рак, циркулирующие опухолевые клетки, локальный противоопухолевый иммунитет, эпителиально-мезенхимальный переход.

CORRELATION ANALYSIS OF INDICATORS OF LOCAL IMMUNITY AND EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER DEPENDING ON THE LEVEL OF CIRCULATING TUMOR CELLS

Sitkovskaya A.O.¹, Novikova I.A.¹, Zlatnik E.Yu.¹, Ulyanova E.P.¹, Shulgina O.G.¹, Kolesnikov V.E.¹, Gabrichidze P.N.¹, Dontsov V.A.¹, Mezentsev S.S.¹

¹National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: grankina.anastasia@mail.ru

Correlation analysis of indicators of local antitumor immunity and markers of epithelial-mesenchymal transition and the number of CTCs in primary patients (60 men) with II-IV stage CRC was carried out. All patients signed informed consent. CTCs were detected in the CellSearchSystem™ (Janssen Diagnostics, LLC). CTC \leq 3 was considered negative (CTC⁻), CTC $>$ 3 – positive (CTC⁺). Tumor material was examined by the IHC for the presence of tumor infiltration by cells of the immune system (CD3, CD4, CD8, CD20, CD56) and E-cad, N-cad. It was shown that with an increase in the prevalence in CTC⁻ patients, the connection between the local levels of CD4⁺ and CD8⁺ is lost, and at IV stage between CD3⁺ and CD4⁺. From III stage, there is a negative correlation between the expression of E- and N-cad, independent of the investigated parameters of cellular local immunity. Probably, the presence of CTCs at all 3 investigated stages of CRC causes the loss of many connections between the indices of the T-, B- and NK-link of cellular local immunity. If CTC⁻ revealed negative correlations between the indices of T-, B- and NK cells, then with CTC⁺ their number decreased to 1. A positive correlation between local CD3⁺ and CD8⁺ levels indicates the predominance of cytotoxic T-cells in the tumor, which was detected in all stages in CTC⁻ patients, and losing reliability in CTC⁺. At II stage, an inverse correlation was noted between CD4⁺ and E-cad expression, which, possibly, reflects the presence of an immunosuppressive and growth-

stimulating fraction of T-regulatory cells among these cells. In general, the presence of CTCs turned out to be more significant for the number and nature of interrelationships of cellular parameters of local immunity than the stage of the disease.

Keywords: colorectal cancer, circulating tumor cells, local antitumor immunity, epithelial-mesenchymal transition.

Метастатический процесс в злокачественных опухолях является многосторонним, и, несмотря на его роль в исходе заболевания и эффективности лечения онкологических больных, остается много вопросов, связанных как со свойствами самой опухоли, так и с состоянием регуляторных систем иммунитета больного [1]. Количество циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в качестве одного из таких механизмов рассматривается и исследуется во всем мире в течение двух последних десятилетий [2]. Результаты корреляции ЦОК и состояния иммунной системы нередко являются противоречивыми и в большинстве своем выполнены на экспериментальных моделях. В связи с этим представляется важной оценка состояния иммунной системы у онкологических больных в зависимости от наличия ЦОК, с учетом того, что она может играть как противоопухолевую, так и проонкогенную роль. Колоректальный рак (КРР) в силу локализации тесно связан не только с системным, но и с локальным иммунитетом [3]. Известно, что у больных с онкологической патологией происходит нарушение различных звеньев иммунитета [4, 5]. Изучение системного иммунного статуса больных КРР после различных оперативных вмешательств показало большую сохранность Т-, В- и НК-клеточного звеньев иммунитета после лапароскопического удаления опухоли толстой кишки, в отличие от открытой операции [6].

Иммунные инфильтраты различаются между типами опухолей и между отдельными пациентами. В одной опухоли могут существовать различные типы иммунных клеток, в том числе врожденные и адаптивные иммунные клетки [7].

Изучение взаимодействия таких системных показателей, как ЦОК, с локальными особенностями иммунологического микроокружения и эпителиально-мезенхимального перехода необходимо для понимания биологии опухоли. Подобные исследования в перспективе могут быть использованы для прогнозирования течения заболевания и разработки новых подходов к лечению.

Цель исследования: проведение корреляционного анализа показателей локального противоопухолевого иммунитета и маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и количества циркулирующих опухолевых клеток у первичных больных с II–IV стадией колоректального рака.

Материал и методы исследования. В исследовании принимали участие 60 первичных больных с II–IV стадией КРР (по 20 человек с каждой стадией). Все больные были проинформированы об исследовании и подписывали согласие на участие в нем.

Детекцию ЦОК у больных выполняли до операции. Для этого проводили забор 8 мл периферической крови из локтевой вены в пробирки Cell Save Preservative Tube (Janssen Diagnostics LLC, США), содержащие антикоагулянт К₂ЭДТА в смеси с реагентом для сохранения жизнеспособности опухолевых клеток. Подготовленные образцы крови помещали в систему анализа CellSearchSystem™ (Janssen Diagnostics LLC, США), которая состоит из двух аппаратов: а) CellTracks® AutoPrep® System, обогащающего суспензию клетками с экспрессией маркера адгезии эпителиальных клеток EpCAM, основного лимфоцитарного маркера CD45 и цитокератинов 8, 18, 19; б) анализатора CellTracks® Analyzer II®. ЦОК \leq 3 считали негативными (ЦОК⁻), ЦОК $>$ 3 – позитивными (ЦОК⁺). Оценку статистической достоверности различий между уровнем ЦОК в группах исследования определяли по t-критерию Стьюдента. Данные выражали средними значениями и их ошибкой.

После оперативного вмешательства проводили иммуногистохимическое (ИГХ) исследование уровня опухолевой инфильтрации клетками иммунной системы с применением моноклональных антител к человеческому CD3, CD4, CD8, CD20 и CD56 (Abcam, Великобритания) и экспрессии белков эпителиально-мезенхимального перехода: E-cadherin, N-cadherin (DAKO, Германия). Данные ИГХ анализа выражали как средние значения выборки в каждой группе. Сравнение совокупностей по количественным признакам проводили по U-критерию Манна–Уитни. U-критерий Манна–Уитни является непараметрическим критерием, поэтому не требует наличия нормального распределения сравниваемых совокупностей и подходит для сравнения малых выборок.

Корреляционный анализ между показателями ИГХ анализа и уровнем ЦОК проводили в программе Statistica. Для выборок, подчиняющихся нормальному закону распределения (согласно критерию Шапиро–Уилка, поскольку выборки менее 50 значений), применяли параметрический коэффициент корреляции Пирсона, а для выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения, – непараметрический коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение. Исследование уровня ЦОК у больных II–IV стадией КРР показало у всех больных системное наличие опухолевых клеток в периферической крови (рис. 1). У пациентов со II стадией КРР ЦОК определяли в 65% случаев (у 13 больных из 20) в количестве от 1 до 7 клеток. Средние значения в данной группе составили $2\pm 0,5$ ЦОК. В группе с III стадией КРР циркулирующие опухолевые клетки детектировали в 85% случаев (у 17 больных из 20), при этом максимальное количество ЦОК – у 1 пациента, а, следовательно, и вариационный разброс уровня ЦОК в данной группе был больше, чем у больных со II стадией КРР данного исследования, и составил от 1 до 47

клеток. Средние значения уровня ЦОК в группе больных с III стадией КРР составили $6,2 \pm 3,8$. В группе с генерализованным КРР (IV стадия) ЦОК выявляли в 75% случаев (у 15 больных из 20). Для больных с IV стадией КРР был характерен большой разброс количества определяемых ЦОК, которые находились в диапазоне от 1 до 121 клеток. Средние значения уровня ЦОК у больных с IV стадией КРР составили $8,4 \pm 4,4$. Высокие значения ЦОК в данной группе встречались лишь в единичных случаях, а именно у 4 больных с количеством ЦОК, равным 17, 20, 31 и 121. Изучение показателей ЦОК в зависимости от стадии опухолевого процесса при КРР не показало связи частоты определения опухолевых клеток в периферической крови со стадией заболевания.

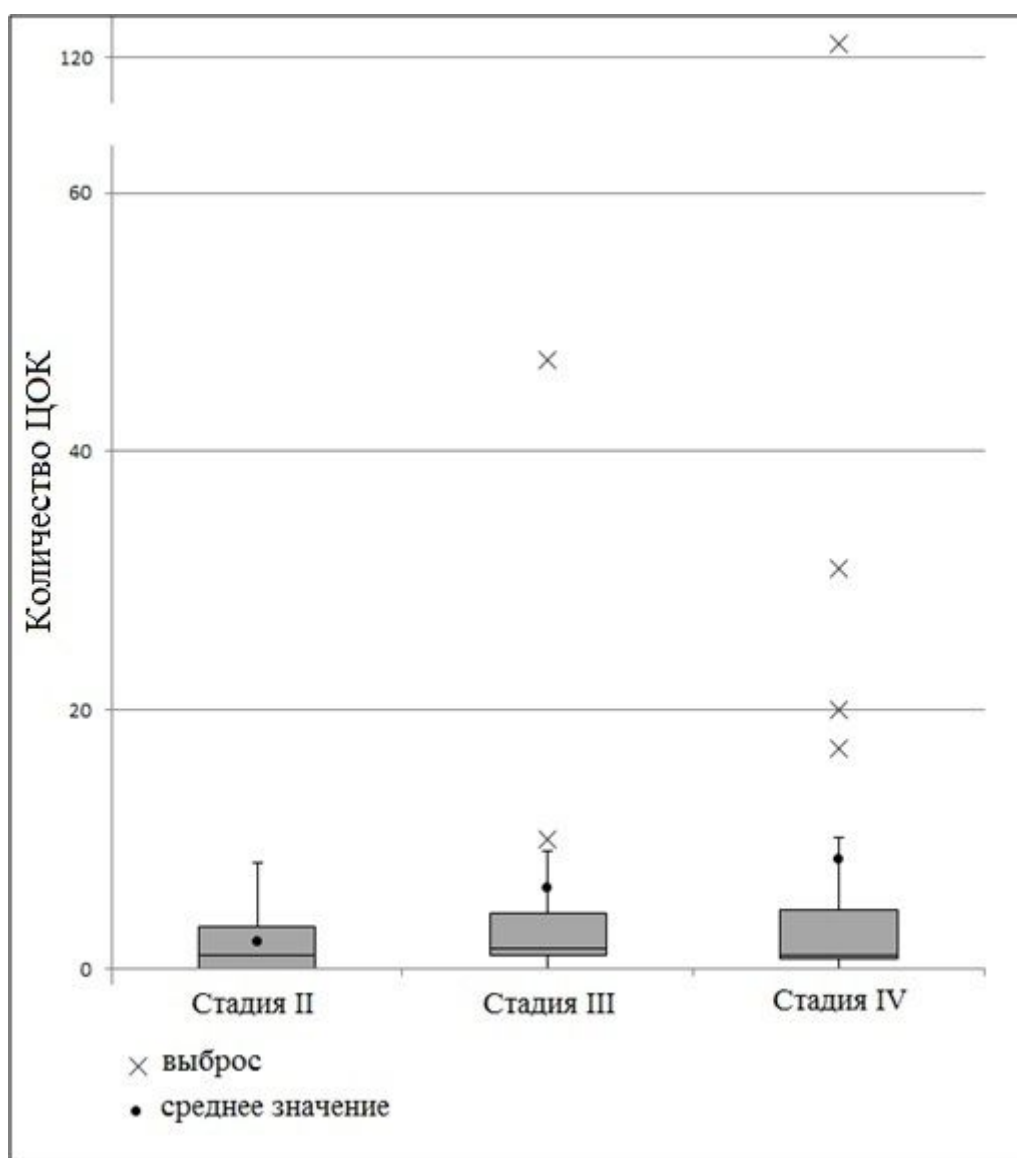


Рис. 1. Диаграмма размаха уровня ЦОК у больных со II–IV стадией КРР

Вместе с тем наблюдали увеличение количества ЦОК при росте злокачественности опухоли, что объяснимо для IV стадии, в которой происходит активное метастазирование опухолевых клеток. Однако для II и III стадий развития опухоли подобное нехарактерно, при

этом мы наблюдали диссеминацию опухолевых клеток уже при местно-распространенном процессе. В свою очередь это согласуется с ранее проведенными экспериментальными исследованиями. Например, Fidler и иные (1970) обнаружили на мышинных экспериментальных моделях метастазирования, что в преметастатических легких через 24 ч после внутривенной инъекции опухолевых клеток лишь 1% сохраняет жизнеспособность [8]. В работе Luzzi и соавт. (1998) на 13-й день после инъекции опухолевых клеток только 1% микрометастазов в печени прогрессировал с образованием макрометастазов, 36% опухолевых клеток оставались изолированными; 95% из них были в состоянии покоя (2% пролиферативные и 3% апоптотические) [9]. В отечественном исследовании А.А. Ковалева и иных (2012) было показано, что лишь 0,01% ЦОК достигают своей метастатической ниши и реализуются в метастазы [10]. Вероятными причинами подобного могут являться механический стресс в кровеносных сосудах, сложность перемещения из одного участка в другой, наличие конечной микросреды, не подходящей для пролиферации, и вмешательство клеток иммунной системы больного (иммунный надзор) [8, 9, 11]. Исходя из этих предположений, возможно, метастазирование опухоли происходит именно при IV стадии из-за увеличения числа опухолевых клеток, циркулирующих в периферической крови больного, что и было показано в нашей работе, хотя и в единичных случаях.

В работе Cohen и иных (2008) было показано, что уровень ЦОК меньше 3 (благоприятный прогноз) или больше 3 (неблагоприятный прогноз) при КРР коррелирует с прогнозом безрецидивной и общей выживаемости [12]. После распределения выборок по уровню ЦОК во всех стадиях преобладали больные с $\text{ЦОК} \leq 3$ (отрицательный уровень ЦОК) (табл.). Наибольшее количество случаев с отрицательным уровнем ЦОК было у больных со II стадией КРР и составило 15 человек (75%). Сравнение количества пациентов с $\text{ЦОК} > 3$ во всех стадиях данного исследования показало наибольшее количество больных с позитивным уровнем ЦОК с III стадией КРР – 8 человек (40%).

Уровень ЦОК у больных со II–IV стадией КРР

Стадия КРР	Уровень ЦОК			
	ЦОК ≤ 3		ЦОК > 3	
	Абс. число	Отн. число (%)	Абс. число	Отн. число (%)
II стадия	15	75	5	25
III стадия	12	60	8	40
IV стадия	14	70	6	30

Проведенное ИГХ исследование показало, что с увеличением стадии КРР от II к IV снижается опухолевая инфильтрация CD3+ клетками (II стадия – 70,9%, IV стадия – 62,05%) за счет уменьшения доли CD8+ клеток (II стадия – 41,2%, IV стадия – 26,8%) и статистически достоверно увеличивается процентное содержание CD20+ клеток (II стадия – 17,05%, IV стадия – 25,0%) ($p \leq 0,05$) (рис. 2).

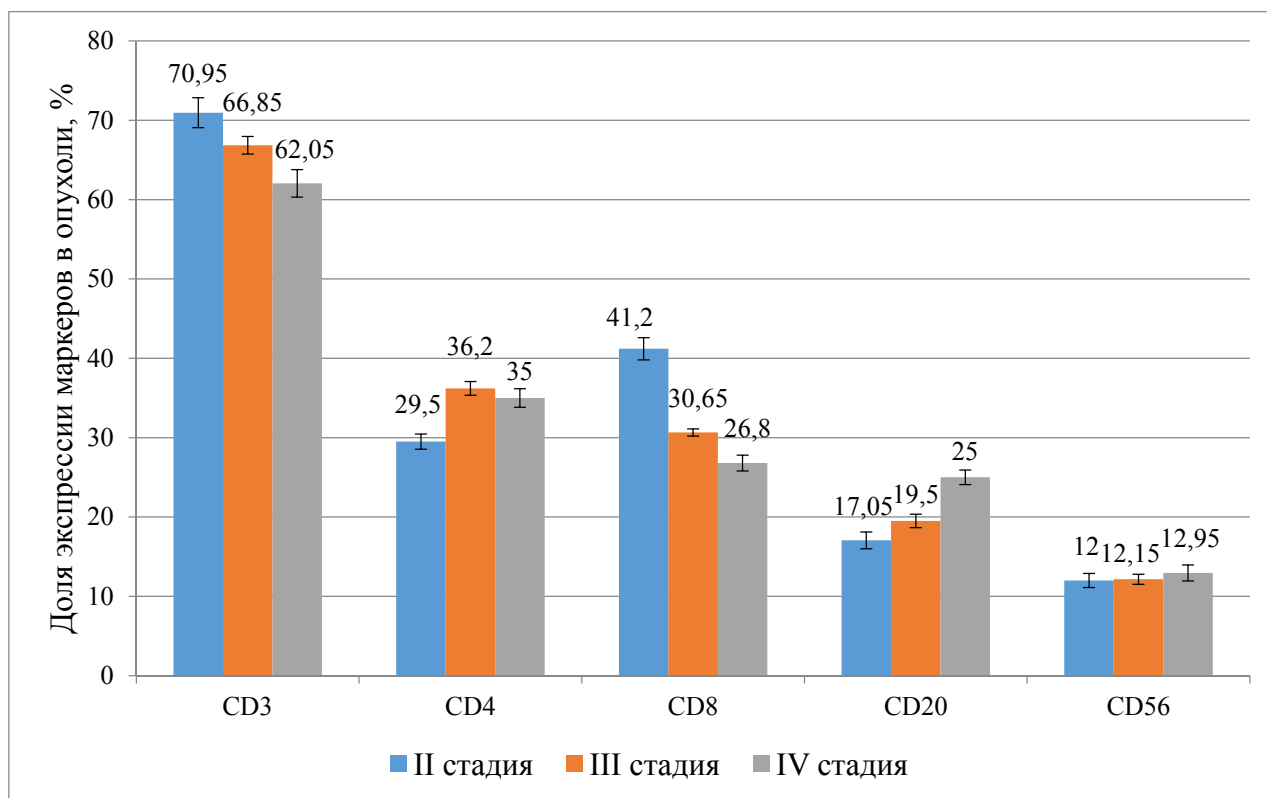


Рис. 2. Уровень опухолевой инфильтрации иммунными клетками у больных колоректальным раком II–IV стадии

Также достоверно снижается экспрессия E-кадгерина (II стадия – 90%, IV стадия – 25%) и повышается N-кадгерин (II стадия – 10%, IV стадия – 75%) ($p \leq 0,05$) (рис. 3).

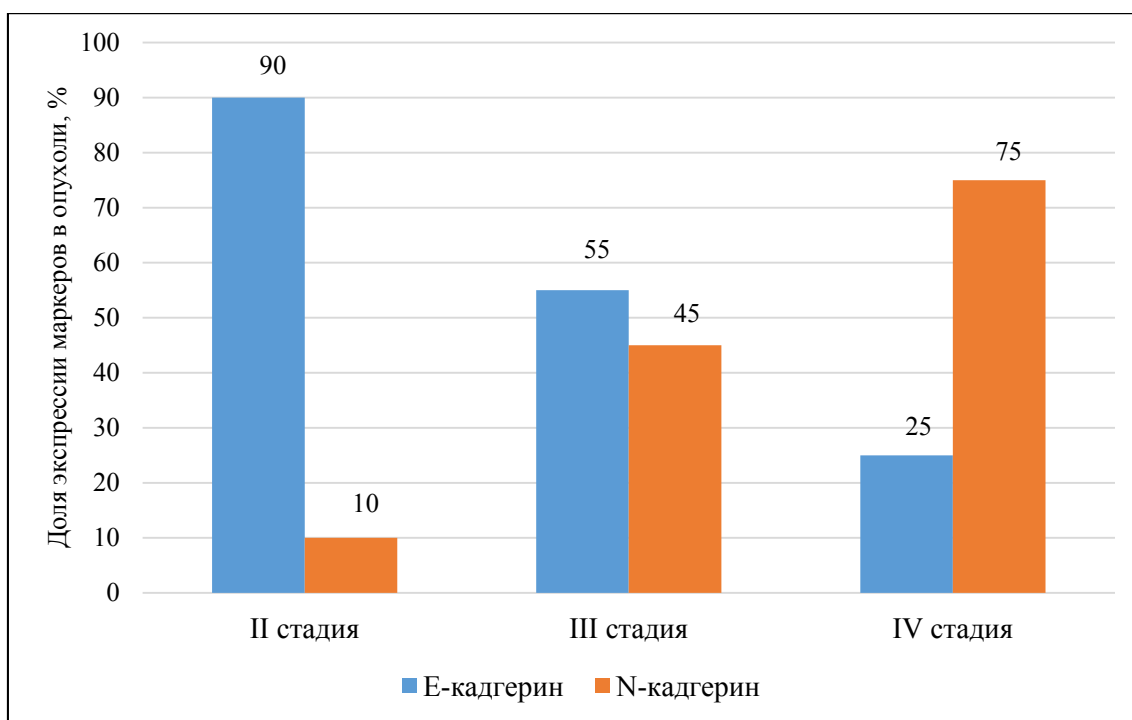


Рис. 3. Уровень экспрессии кадгеринов в опухолевых клетках у больных колоректальным раком II–IV стадии

Проведенный корреляционный анализ показал ряд статистически достоверных корреляций (например, потерю связи между показателями локального иммунитета у больных с ЦОК⁺ во II стадии КРР). Вместе с тем возникает отрицательная корреляция между CD4⁺ и экспрессией Е-кадгерина ($p < 0,05$). Подобные изменения были отмечены и при III стадии, однако у этих больных возникают корреляции между Е- и N-кадгерином ($p < 0,05$), что, вероятно, говорит об усилении эпителиально-мезенхимального перехода. У больных с IV стадией КРР были получены аналогичные данные.

При исследовании показателей ЦОК⁻-больных в III стадии КРР в сравнении с данными у ЦОК⁻-больных во II стадии обнаружена потеря связи локальных уровней CD4⁺ и CD8⁺, а у ЦОК⁻-больных с IV стадией – и между CD3⁺ и CD4⁺. У тех же больных, начиная с III стадии, отмечается отрицательная корреляция между экспрессией Е- и N-кадгерина ($p < 0,05$), не связанная с исследованными показателями клеточного локального иммунитета.

У ЦОК⁺-больных при всех трех исследованных стадиях КРР происходит потеря многих связей между показателями 3 звеньев клеточного локального иммунитета. Если у ЦОК⁻-больных выявлены отрицательные корреляции между показателями Т-, В- и НК-клеток, то у ЦОК⁺-больных их количество сократилось до одной. Важной представляется положительная корреляция между локальными уровнями CD3⁺ и CD8⁺, выявленная при всех стадиях у ЦОК⁻-больных и свидетельствующая о преобладании цитотоксических Т-

клеток в опухоли. У ЦОК⁺-больных данная корреляция теряет достоверность независимо от стадии.

При II стадии у больных с ЦОК⁺ отмечена обратная корреляция между показателями локального иммунитета и экспрессией эпителиальных и мезенхимальных маркеров: между уровнем CD4-лимфоцитов и E-кадгерина в опухолевых клетках, что, возможно, отражает наличие среди этих клеток иммуносупрессивной и ростостимулирующей фракции T-регуляторных клеток.

Заключение. В ходе проведенного многоэтапного исследования системных показателей, таких как ЦОК, и локальных – уровня иммунологического микроокружения и эпителиально-мезенхимального перехода – у пациентов со II–IV стадией КРР была отмечена потеря взаимосвязи факторов локального иммунитета у ЦОК⁺-больных по сравнению с ЦОК⁻-больными. Помимо этого, в нашей работе наличие ЦОК оказалось более значимым для определения количества и характера соотношения клеточных показателей локального иммунитета, чем стадия заболевания.

Список литературы

1. Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017. vol. 168. P. 670–691. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.037.
2. Leone K., Poggiana C., Zamarchi R. The Interplay between Circulating Tumor Cells and the Immune System: From Immune Escape to Cancer Immunotherapy. *Diagnostics (Basel)*. 2018. vol. 8. no 3. P. 59. DOI:10.3390/diagnostics8030059.
3. Кит О.И., Шуликов П., Новикова И.А., Гранкина А.О., Колесников В.Е., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.С. Циркулирующие опухолевые клетки при колоректальном раке // *Врач*. 2017. № 5. С. 42-45.
4. Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Никипелова Е.А., Новикова И.А. Местный клеточный иммунитет при аденокарциноме и полипах толстой кишки // *Сибирское медицинское обозрение*. 2012. Т. 4. № 76. С. 11-16.
5. Кит О.И., Кириченко Е.Ю., Новикова И.А., Максимов А.Ю., Филиппова С.Ю., Гранкина А.О., Златник Е.Ю. Иммунотерапия колоректального рака: современное состояние и перспективы (обзор) // *Современные технологии в медицине*. 2017. Т. 9. № 3. С. 138-150.
6. Колесников В.Е., Кит О.И., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Гранкина А.О., Геворкян Ю.А., Максимов А.Ю. Анализ иммунного статуса больных колоректальным раком после различных вариантов оперативного вмешательства // *Современные проблемы науки и*

образования. 2016. № 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25733> (дата обращения: 25.08.2020).

7. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumors: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer*. 2012. vol. 12. no 4. P. 298–306.
8. Fidler I.J. Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* 1970. vol. 45. P. 773–782.
9. Luzzi K.J., MacDonald I.C., Schmidt E.E., Kerkvliet N., Morris V.L., Chambers A.F., Groom A.C. Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* 1998. vol. 153. P. 865–873. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65628-3.
10. Ковалев А.А., Грудинская Т.В., Кузнецова Т.П., Ковалев К.А. Гетерогенность циркулирующих опухолевых клеток // *Онкология*. 2012. Т. 14. № 2. С. 126-129.
11. Strilic B., Offermanns S. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell*. 2017. vol. 32. P. 282–293. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.07.001.
12. Cohen S.J., Punt C.J., Iannotti N., Saidman B.H., Sabbath K.D., Gabrail N.Y., Picus J., Morse M., Mitchell E., Miller M.C., Doyle G.V., Tissing H., Terstappen L.W., Meropol N.J. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008. vol. 26. no 19. P. 3213–3221.