

ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛЬНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ РАКЕ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛОКАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА

Кит О.И.¹, Дженкова Е.А.¹, Мирзоян Э.А.¹, Сагакянц А.Б.¹, Бондаренко Е.С.¹,
Златник Е.Ю.¹, Шапошников А.В.¹, Колесников Е.Н.¹, Каймакчи О.Ю.¹, Дашков А.В.¹,
Каминский Г.В.¹, Малинин С.А.¹, Милакин А.Г.¹, Савченко Д.А.¹, Чалхакян Л.Х.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: ellada-mirzoyan@yandex.ru

Актуальным вопросом в современной онкологии стало изучение роли различных звеньев иммунной системы в развитии и клиническом течении онкозаболевания. Опухоли толстой кишки инфильтрированы различными иммунными и воспалительными клетками, а ряд исследований показывают, что наибольшее значение имеет число Т-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. Цель исследования: выявить особенности локального популяционного и субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток при раке ободочной кишки различной локализации опухоли. В исследование вошли 50 пациентов с раком ободочной кишки (РОК). Из фрагмента опухоли, перифокальной зоны (1–3 см от опухоли), линий резекции (~10 см от опухоли) получали суспензии клеток, которые обрабатывали панелью антител для идентификации основных популяций и субпопуляций лейкоцитов на проточном цитометре BD FACSCanto. Определили снижение лимфоцитарной инфильтрации в тканях опухоли левой половины ободочной кишки по сравнению с правой на 47%. Особенностью опухолей левосторонней локализации была инфильтрация опухоли NK- клетками, которая больше на 28%, чем при правосторонней локализации. В перифокальной зоне опухолей левой половины ободочной кишки определялось снижение на 59%, 26%, 34% и 30% относительного количества лимфоцитов, NK, NKT- и CD19+ соответственно по сравнению с перифокальной зоной опухолей правой половины ободочной кишки. Выявлено значимое повышение содержания CD8+- и ДП клеток (CD3+CD4+CD8+) – на 107% и 425% соответственно – при левосторонней локализации процесса в отсутствие изменений CD3+-, CD4+-клеток. В отдаленном участке при опухолях левосторонней локализации отмечено повышение лимфоцитарной инфильтрации, процентного содержания CD8+-клеток, ДП по сравнению с правосторонней локализацией на 25%, 34% и 50% соответственно.

Ключевые слова: колоректальный рак, рак ободочной кишки, онкоиммунология, локальный клеточный иммунитет, основные популяции и субпопуляции лимфоцитов.

CHARACTERISTICS OF LOCAL CELLULAR IMMUNITY IN COLON CANCER DEPENDING ON TUMOR LOCATION

Kit O.I.¹, Dzhenkova E.A.¹, Mirzoyan E.A.¹, Sagakyants A.B.¹, Bondarenko E.S.¹,
Zlatnik E.Yu.¹, Shaposhnikov A.V.¹, Kolesnikov E.N.¹, Kaymakchi O.Yu.¹, Dashkov A.V.¹,
Kaminskiy G.V.¹, Malinin S.A.¹, Milakin A.G.¹, Savchenko D.A.¹, Chalkhakhyan L.Kh.¹

¹Federal State Budgetary Institution «National medical research centre for oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation («National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia»), Rostov-on-Don, e-mail: ellada-mirzoyan@yandex.ru

The role of various components of the immune system in the development and clinical course of malignant tumors is an urgent issue in modern oncology. Colon tumors are infiltrated by various immune and inflammatory cells, and a number of studies show that the number of T-lymphocytes. The purpose of the study: to reveal characteristics of the local populations and subpopulations of immunocompetent cells in colon cancer with various tumor locations. The study included 50 patients with colon cancer. Cell suspensions were prepared from the tumor fragments, peritumoral tissues and resection line tissues. Cell suspensions were processed with a panel of antibodies to identify the main populations and subpopulations of leukocytes and lymphocytes using the BD FACSCanto flow cytometer. A decrease in lymphocytic infiltration was determined in tissues of left-sided tumors, compared to right-sided ones, by 47%. Left-sided tumors were characterized with 28% higher tumor infiltration with NK cells, compared with right-sided tumors. The perifocal tissues of left-sided colon tumors showed a decrease in the relative numbers of lymphocytes, NK, NKT and CD19+ by 59%, 26%, 34% and 30%, respectively, compared with right-sided tumors. A significant increase in the numbers of CD8+- and DP cells was revealed - by 107% and 425%, respectively, in left-sided colon cancer, with the absence of changes in CD3+-, CD4+-cells. The

remote area in left-sided tumors showed an increase in lymphocytic infiltration, the percentage of CD8+ cells and DP by 25%, 34% and 50%, respectively, compared to right-sided tumor location.

Keywords: colorectal cancer, colon cancer, cancer immunology, local cellular immunity, main populations and subpopulations of lymphocytes.

Колоректальный рак (КРР) является актуальной проблемой современной онкологии, занимает одно из лидирующих мест в структуре заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний во всем мире. Ежегодно выявляются более 1 млн новых случаев КРР приблизительно с одинаковой частотой распространения у мужчин и женщин [1, 2].

Сегодня разработано большое количество современных методов визуализации. Но, несмотря на значительные диагностические возможности, показатели запущенности КРР остаются высокими. На момент обращения больного, как правило, онкопроцесс имеет местно-распространенный характер с наличием лимфогенных и отдаленных гематогенных метастазов [3, 4].

Больше половины случаев КРР приходится на рак ободочной кишки (РОК), который занимает 4-е место в структуре общей онкологической заболеваемости (оба пола), 5-е место в структуре онкологической заболеваемости у мужского населения и 4-е место – у женского [5].

В последнее время актуальным предметом исследований в современной онкологии является изучение роли различных звеньев иммунной системы в развитии, клиническом течении, прогрессировании опухолевого процесса [6]. Эффекторные и регуляторные механизмы системы врожденного и приобретенного иммунитета, взаимодействуя с опухолевыми клетками, определяют биологические особенности последних и влияют на процессы возникновения опухолей, их метастазирования, а также устойчивость к радио- и химиотерапевтическому лечению опухоли. Доказана двузначная роль иммунной системы в канцерогенезе: как противоопухолевых эффектов, так и опухоль-стимулирующих. В сложившейся ситуации особую актуальность приобретает изучение роли отдельных компонентов как адаптивного, так и врожденного иммунитета.

Иммунная система пищеварительного тракта играет важную роль в защите организма от действия инфекционных агентов, токсинов, осуществляет их инактивацию и элиминацию.

Сегодня доказано, что местные и системные воспалительные реакции имеют большое значение в прогрессировании опухолевого процесса, влияя на исход заболевания. Опухоли толстой кишки инфильтрированы различными иммунными и воспалительными клетками. Ряд исследований показал, что наибольшее значение имеет число Т-лимфоцитов, которые инфильтрируют опухоль [7]. Как известно, ткань опухолей толстой кишки содержит небольшое количество Т-лимфоцитов с рецепторами CD4+ и CD8+ [8].

Ряд авторов рассматривают макрофагальную инфильтрацию опухоли и перитуморальной зоны как прогностический фактор: низкая плотность инфильтрации связана с более высокими инвазивными свойствами опухоли [9–10].

В зарубежной литературе имеется ряд исследований по изучению опухолеинфильтрирующих иммунокомпетентных клеток и их прогностической значимости при КРР, но на сегодняшний день остается много спорных и нерешенных вопросов [11–13]. В литературе отсутствуют данные, посвященные изучению локального клеточного иммунитета при РОК в зависимости от локализации опухолевого процесса, что и определяет актуальность нашего исследования.

Цель исследования: выявить особенности локального популяционного и субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток при раке ободочной кишки различной локализации опухоли.

Материал и методы исследования

В исследование включены 50 пациентов с РОК, которые проходили лечение в отделениях абдоминальной онкологии № 1 с группой рентгенэндоваскулярных методов диагностики и лечения и абдоминальной онкологии № 2 ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

Критерии включения в работу:

- 1) наличие гистологически верифицированной аденокарциномы ободочной кишки;
- 2) TNM – $T_{1-4}N_{0-2}M_0$;
- 3) статус ECOG – 0–2;
- 4) возраст более 18 лет;
- 5) подписанное информированное согласие.

Критерии исключения: наличие терапевтических или психиатрических заболеваний; беременность или период лактации; наличие синхронных злокачественных опухолей; наличие острой хирургической патологии.

В выборку вошли 26 женщин (52%), средний возраст которых составил $67 \pm 0,4$ года, и 24 мужчины (48%) со средним возрастом $66 \pm 0,3$ года. Преобладали пациенты, имеющие II стадию онкопроцесса, – 25 (50%) (рис. 1).

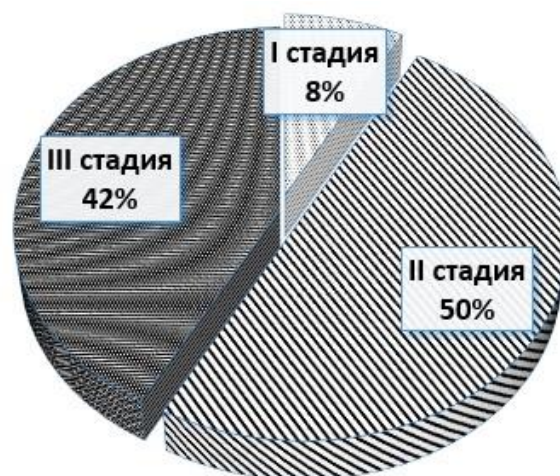


Рис. 1. Распределение больных по стадии заболевания: I стадия – 8%, II стадия – 50%, III стадия – 42%

В зависимости от локализации опухолевого процесса (правая половина и левая половина ободочной кишки) пациенты были разделены на 2 равные группы по 25 человек в каждой.

На первом этапе лечения всем пациентам было проведено стандартное хирургическое вмешательство с забором материала для проведения дальнейших исследований. Из фрагмента опухоли, перифокальной зоны (1–3 см от опухоли), линии резекции (~10 см от опухоли) получали суспензии клеток, которые обрабатывали панелью антител в соответствии с указаниями фирмы-производителя (Becton Dickinson, USA) для идентификации основных популяций и субпопуляций лейкоцитов и лимфоцитов с использованием проточного цитометра BD FACSCanto (Becton Dickinson, USA). Результаты выражали в относительном количестве основных популяций и субпопуляций лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, ДП (CD3+CD4+CD8+), ДН (CD3+CD4-CD8-), NK, TNK, CD19+) по отношению к общему числу лимфоцитов, имеющих вышеобозначенные рецепторы. Формировали базу полученных данных с использованием Microsoft Excel. Формирование первичной базы данных, содержащей количественные значения определяемых параметров, осуществляли с использованием пакета программ MS Office Excel 2016.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета STATISTICA 13,3 (StatSoft Inc., США), что предполагало расчет основных статистических характеристик выборок, определение характера распределения определяемых показателей с использованием критерия Шапиро–Уилка. Достоверность отличий между выборками оценивалась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные данные субпопуляций лимфоцитов в опухолевой ткани, перитуморальной зоне (1–3 см) и линии резекции (~10 см) в правой и левой половинах ободочной кишки представлены в таблице и на рисунках 2, 3, 4.

Субпопуляционный клеточный состав иммунокомпетентных клеток в тканях опухоли, Ме, %

Субпопуляция лимфоцитов	Опухоль n=50	
	Правая половина ободочной кишки n=25	Левая половина ободочной кишки n=25
Лимфоциты	3,9	2,05*
CD3+	86,75	78,8
CD4+	49,15	53,7
CD8+	43,55	39,1
ДП (CD3+CD4+CD8+)	0,6	0,5
ДН (CD3+CD4-CD8-)	5,55	4,25
NK	2,35	3
NKT	5,45	6,05
CD19+	5,5	11,4*

Примечание: * – статистически значимые различия по критерию Стьюдента ($p<0,05$)

Отмечено снижение лимфоцитарной инфильтрации в тканях опухоли левой половины ободочной кишки по сравнению с правой половиной на 47% ($p<0,05$). При этом процентное содержание CD3+, CD4+, CD8+-клеток было практически одинаково независимо от локализации опухоли. Отличительной особенностью опухолей левосторонней локализации является инфильтрация опухоли НК-клетками, которая больше на 28%, чем при правосторонней локализации ($p<0,05$). Для опухолей левой половины ободочной кишки характерно увеличение содержание CD19+ до 107%, чем при опухолях правой половины ($p<0,05$) (рис. 2).

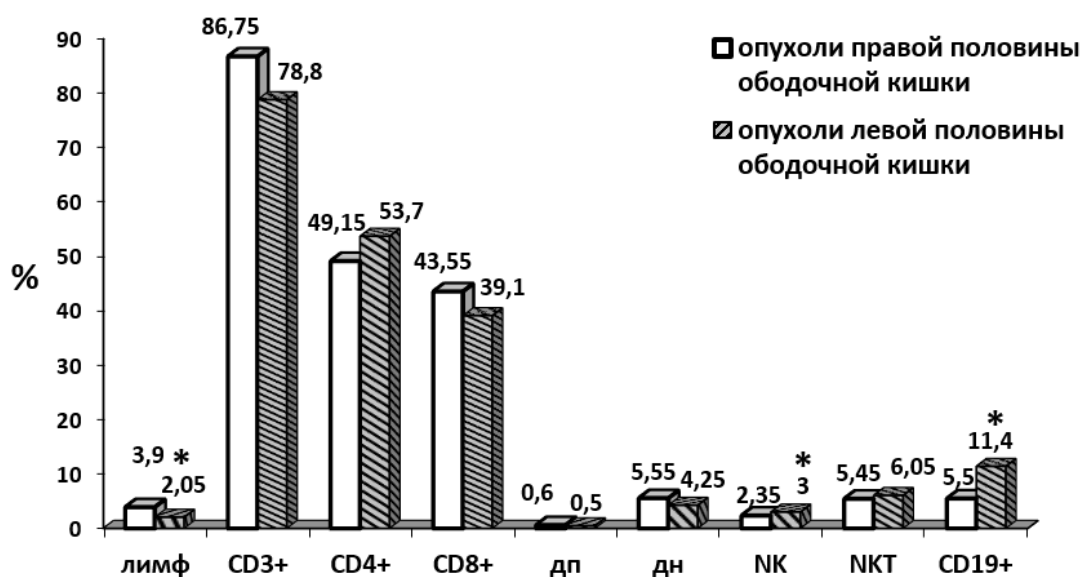


Рис. 2. Субпопуляционный состав в тканях опухоли группы пациентов с РОК различной локализации (правой и левой половины ободочной кишки), * $p < 0,05$, статистически значимые различия

В перифокальной зоне опухолей левой половины ободочной кишки выявлено снижение на 59%, 26%, 34% и 30% относительного количества лимфоцитов, NK-, NKT- и CD19+ соответственно по сравнению с перифокальной зоной опухолей правой половины ободочной кишки ($p < 0,05$). Также отмечено значимое повышение содержания CD8+- и ДП клеток на 107% и 425% соответственно при левосторонней локализации процесса в отсутствие изменений CD3+-, CD4+-клеток ($p < 0,05$) (рис. 3).

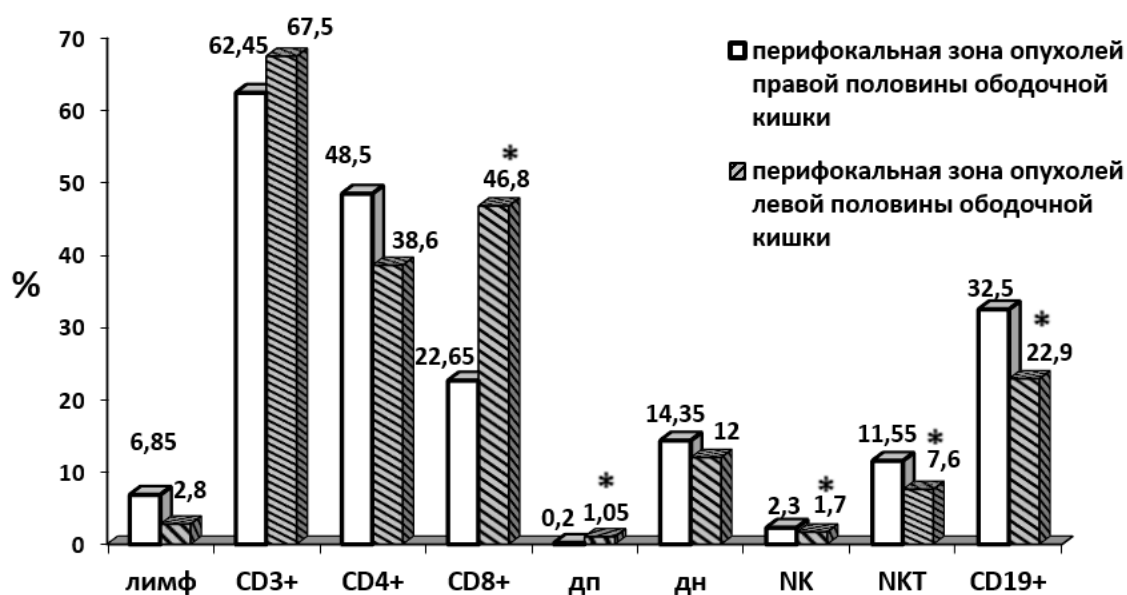


Рис. 3. Субпопуляционный состав в тканях перифокальной зоны группы пациентов с РОК различной локализации (правой и левой половины ободочной кишки), * $p < 0,05$, статистически значимые различия

В отдаленном участке при опухолях левосторонней локализации отмечено повышение лимфоцитарной инфильтрации, процентного содержания лимфоцитов, CD8⁺-клеток, ДП по сравнению с правосторонней локализацией на 25%, 34% и 50% соответственно (рис. 4).

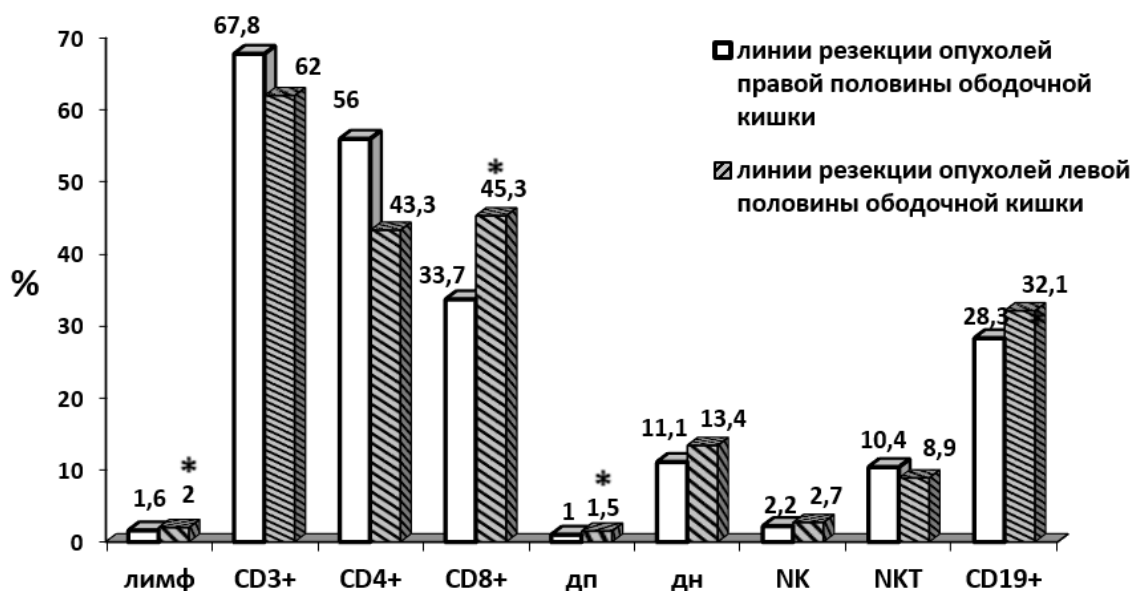


Рис. 4. Субпопуляционный состав в тканях отдаленного участка кишки группы пациентов с РОК различной локализации (правой и левой половины кишки), * $p < 0,05$, статистически значимые различия

Результаты исследования и их обсуждение. В литературе существуют данные, свидетельствующие о том, что ткань колоректальной опухоли инфильтрирована малым количеством Т-лимфоцитов. J.R. Jass et al. (1987) доказали, что выраженная лимфоцитарная инфильтрация вокруг опухолевой ткани является прогностическим фактором более длительной выживаемости пациентов КРР [11–13]. С одной стороны, большее скопление CD8⁺ Т-клеток в опухолевой ткани достоверно коррелировало с более длительной выживаемостью пациентов, а с другой – значительное количество CD8⁺ Т-клеток в строме опухоли и вдоль ее инвазивного края не являлось важным прогностическим фактором выживаемости [14, 15]. Данные результаты позволили сделать вывод, что значение имеет не только количественный и качественный состав иммунокомпетентных клеток, которые присутствуют в опухоли.

А.С. Diederichsen et al. доказали следующий факт: низкое соотношение опухолеинфильтрирующих лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺ является прогностическим фактором более длительной выживаемости пациентов с КРР [16].

В исследовании Е.А. Никипеловой и соавт. показано, что содержание CD3+, CD4+ в ткани опухоли было статистически достоверно выше на 45,0%. В 1,8 раза и на 52,0% был выше индекс CD4+/CD8+ в сравнении с показателями условно здоровой ткани и ткани перитуморальной зоны ($p<0,05$), а также на 19% снижено количество CD8+-клеток и В-лимфоцитов на 22,0% по сравнению с условно здоровой тканью и на 43,0% относительно перитуморальной зоны ($p<0,05$).

Полученные Е.А. Никипеловой и соавт. данные о тканевом составе иммунокомпетентных клеток в опухоли и непораженной ткани толстой кишки обусловили разработку критериев для прогноза потенциально возможного развития метастазов КРР [17].

Выводы

При изучении локального иммунного статуса пациентов с РОК в нашем исследовании отмечается ряд следующих особенностей.

1. В опухолях правой половины ободочной кишки отмечается более высокая Т-лимфоцитарная инфильтрация по сравнению с опухолями левой половины, для которых характерна повышенная В-лимфоцитарная инфильтрация.

2. В тканях перифокальной зоны при опухолях левосторонней локализации наблюдаются снижение относительного количества лимфоцитов, NK-, NKT- и В-лимфоцитов и значительное повышение содержания CD8+- и ДП клеток.

3. При изучении популяционного состава линий резекции при опухолях левосторонней локализации отмечено повышение лимфоцитарной инфильтрации, процентного содержания CD8+-клеток, ДП лимфоцитов.

4. Таким образом, выявленные особенности локального популяционного и субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток при РОК в зависимости от локализации опухолевого процесса могут определить клиническое течение заболевания и способствовать выбору тактики дальнейшего лечения.

Список литературы

1. Кит О.И. Проблема колоректального рака в начале XXI века: достижения и перспективы // Российский журнал Гастроэнтерологии, Гепатологии, Колопроктологии. 2013. Т. 3. № 23. С. 65–71.
2. Мараткызы М., Кабилдина Н.А., Бейсенаева А.Р., Сарлыбаева В.О. // Эпидемиологические аспекты колоректального рака. Медицина и экология. 2020. Т. 2. № 95. С. 15-20.
3. Кит О.И., Дженкова Е.А., Мирзоян Э.А., Геворкян Ю.А., Сагакянц А.Б., Тимошкина Н.Н., Каймакчи О.Ю., Каймакчи Д.О., Толмах Р.Е., Дашков А.В., Колесников В.Е., Милакин

- А.Г., Полуэктов С.И. Молекулярно-генетическая классификация подтипов колоректального рака: современное состояние проблемы // Южно-Российский онкологический журнал. 2021. Т. 2. № 2. С. 50-56.
4. Осомбаев М.Ш., Джекшенов М.Д., Сатыбалдиев О.А., Абдрасулов К.Д., Макимбетов Э.К., Кузикеев М.А. Эпидемиология колоректального рака // Научное обозрение. Медицинские науки. 2021. Т. 1. С. 37-42.
5. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
6. Сагакянц А.Б. Объединенный иммунологический форум: современные направления развития фундаментальной и прикладной онкоиммунологии (Новосибирск, 2019) // Южно-российский онкологический журнал. 2020. Т. 1. № 2. С. 36-45.
7. Schreiber R.D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science. 2011.vol. 331. P. 1565–1570.
8. Gratz K., Rosenblum M.D., Abbas A.K. The life of regulatory T cells. Annals of the New York Academy of Sciences. 2013. vol. no. 1283. P. 8–12.
9. Väyrynen J.P., Tuomisto A., Klintrup K., Mäkelä J., Karttunen T.J., Mäkinen M.J. Detailed analysis of inflammatory cell infiltration in colorectal cancer. British Journal of Cancer. 2013. vol. 109. P. 1839–1847.
10. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никипелова Е.А., Комарова, Е.Ф., Козлова Л.С., Таварян И.С., Аверкин М.А., Черярина Н.Д. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015. Т. 114. № 2. С. 40–45.
11. Pages F., Galon J., Fridman W.H. The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer. Journal of Leukocyte Biology. 2008. vol. 84. P. 981-985.
12. Grizzi F., Bianchi P., Malesci A., Laghi L. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer. World Journal of Gastroenterology. 2013. vol. 19. no. 2. P. 174-184.
13. Mei Z., Liu Y., Liu C., Cui A., Liang Z., Wang G., Peng H., Cui L., Li C. Tumor-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. British Journal of Cancer. 2014. vol. 110. P. 1595–1605.
14. Chiba T., Ohtani H., Mizoi T., Naito Y., Sato E., Nagura H., Ohuchi A., Ohuchi K., Shiiba K., Kurokawa Y., Satomi S. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. British Journal of Cancer. 2004. vol. 91. P. 1711-1717.
15. Nosho K., Baba Y., Tanaka N., Shima K., Hayashi M., Meyerhardt J.A., Giovannucci E., Dranoff G., Fuchs C.S., Ogino S. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal

cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *Journal of Pathology*. 2010. vol. 222. P. 350–366.

16. Diederichsen A.C., Hjelmborg J.B., Christensen P.B., Zeuthen J., Fenger C. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2003. vol. 52. P. 423–428.

17. Никипелова Е.А., Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Владимирова Л.Ю., Позднякова В.В., Лысенко И.Б., Шевченко А.Н., Демидова А.А. Иммунологические критерии развития отдаленных метастазов рака толстой кишки // *Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки*. 2017. Т. 3. № 2. С. 96-101. DOI: 10.23683/0321-3005-2017-3-2-96-10.