

ВЗАИМОСВЯЗЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК С УРОВНЕМ СА-125 И ОБЪЕМОМ ОПУХОЛЕВОЙ МАССЫ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

Черных Е.Р., Курганова Е.В., Тихонова М.А.,
Ласкавая Е.Г.¹, Лебедева В.А.¹, Останин А.А.

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

¹ Городская муниципальная клиническая больница № 1, г. Новосибирск

Резюме. В настоящей работе исследована взаимосвязь между содержанием различных субпопуляций регуляторных Т-клеток (Treg) и сывороточным уровнем СА-125, а также динамика Treg после хирургического удаления опухоли у больных раком яичников (РЯ). Характерные для РЯ изменения Treg в периферической крови (повышение CD4⁺FoxP3⁺ и CD8⁺FoxP3⁺ Т-клеток и снижение CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25^{high} Т-клеток в связи с их миграцией в асцитическую жидкость) выявлялись только у женщин с повышенным уровнем СА-125 и не регистрировались в подгруппе пациенток с нормальным содержанием данного антигена. Уровень СА-125 прямо коррелировал с абсолютным количеством CD4⁺CD25^{high} Т-клеток и находился в обратной зависимости с количеством CD8⁺FoxP3⁺ клеток. Хирургическое удаление опухоли сопровождается выраженным снижением уровня СА-125 у всех обследованных. Однако изменения Treg выявлялись только в подгруппе женщин с радикальной операцией и проявлялись нормализацией CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25^{high} Т-клеток, тогда как у женщин с остаточным опухолевым объемом численность этих клеток в периферической крови оставалось сниженной. При этом относительное содержание CD4⁺FoxP3⁺ и CD8⁺FoxP3⁺ Т-клеток через 2 недели после хирургического удаления опухоли не менялось, и оставалось повышенным, что ассоциировалось с сохранением сниженной пролиферативной активности Т-клеток при стимуляции анти-CD3 антителами.

Ключевые слова: Т-клетки регуляторные, FoxP3⁺, СА-125, масса опухоли яичников.

Chernykh E.R., Kurganova E.V., Tikhonova M.A., Laskavaya E.G., Lebedeva V.A., Ostanin A.A.

RELATION BETWEEN REGULATORY T CELLS, CA-125 LEVEL AND TUMOR MASS IN OVARIAN CANCER PATIENTS

Abstract. The relationship between various subpopulations of regulatory T-cells (Treg) and serum level of CA-125 and dynamics of Treg following surgery in ovarian cancer (OC) patients have been investigated. The typical for OC peripheral blood Treg changes (the enrichment of CD4⁺FoxP3⁺ and CD8⁺FoxP3⁺ T-cells and decrease of CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25^{high} T-cells due to their migration to ascites) have been revealed only in patients with elevated CA-125 level and were not registered in patient's group with normal level of this antigen. CA-125 serum level was directly correlated to absolute count of CD4⁺CD25^{high} T-cells and was in reverse relation to CD8⁺FoxP3⁺ T-cells. Surgical removal of a tumor was accompanied by remarkable reduction of CA-125 level in all cases. However Treg changes were observed only in patients with optimal cytoreductive surgery and were evidenced by CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25^{high} T-cell normalization, whereas the number of these cells in peripheral blood of patients with residual tumors after surgery remained decreased. At that percentage of CD4⁺FoxP3⁺ and CD8⁺FoxP3⁺ T-cells 2 weeks after surgery was unchanged and their increased number was associated with persisted decrease of T-cell proliferation in response to anti-CD3 stimulation. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 311-318)

Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14,
НИИ клинической иммунологии СО РАМН.
Тел.: (383) 236-03-29
Факс: (383) 222-70-28
E-mail: ct_lab@mail.ru

Keywords: Treg, FoxP3⁺, CA-125, ovarian tumor mass.

Введение

Увеличение регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью (Treg) выявлено при многих формах злокачественных опухолей. Миграция и накопление этих клеток в первичных и метастатических очагах рассматривается в качестве одного из ведущих механизмов ускользания опухоли от иммунного надзора и резистентности к иммунотерапии [6, 10, 27].

Важно отметить, что Treg являются гетерогенной популяцией и различаются по происхождению (естественные и индуцированные Treg), фенотипу и механизмам действия [18]. Поскольку многие опухоль-ассоциированные антигены (ОАА) в своем составе включают детерминанты (эпитопы) собственных тканей и индуцируют появление аутореактивных клонов, рост опухоли неизбежно сопровождается возрастанием естественных Treg тимического происхождения, участвующих в поддержании толерантности к аутоантигенам. Кроме того, опухолевый рост сопровождается генерацией индуцированных Treg, которые могут образовываться из циркулирующих Т-клеток в условиях «неадекватной» антигенной презентации или повышенного уровня иммуносупрессивных цитокинов. Однако соотношение этих субпопуляций Treg и характер их распределения при разных формах опухолей, так же как их удельный вес в подавлении противоопухолевого иммунного ответа остаются практически не исследованными [18, 26].

При раке яичников (РЯ) возрастание Treg проявляется увеличением в асцитической жидкости и опухолевой ткани субпопуляции естественных CD4⁺CD25⁺ Treg, которые мигрируют в зону опухолевого микроокружения в результате взаимодействия хемокина CCL22, продуцируемого опухолевыми клетками и макрофагами, с его лигандом (CCR4) на поверхности CD4⁺CD25⁺ Treg [12, 25]. Проведенные нами исследования также показали, что накопление CD4⁺CD25⁺ Т-клеток и в том числе CD4⁺Т-клеток с высокой экспрессией CD25 (CD4⁺CD25^{high}) в асцитической жидкости у женщин с РЯ сопровождается достоверным уменьшением этих клеток в периферической крови. С другой стороны, в циркуляции отмечается возрастание количества CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток с внутриклеточной экспрессией транскрипционного фактора FoxP3⁺ [1, 2], которые по нашему мнению могут представлять индуцированные Treg. Действительно, недавние исследования показали, что транскрипционный фактор FoxP3⁺, считавшийся ранее маркером исключительно естественных Treg [13, 17], может также экспрессироваться индуцированными регуляторными Т-клетками, в том числе образующимися из CD25-негативных наивных CD4⁺Т-

лимфоцитов [11, 24]. Причем присутствие таких клеток обнаружено при различных формах рака, например, при колоректальном раке и раке предстательной железы [9, 21].

Несмотря на достаточно большое количество исследований регуляторных Т-клеток, остается неясным, насколько количественные изменения различных субпопуляций Treg сопряжены с уровнем ОАА, с объемом и характером роста опухоли. Кроме того, в литературе практически отсутствуют данные о динамике различных субпопуляций Treg после хирургического удаления опухоли.

Одним из биомаркеров РЯ является антигенная детерминанта муцино-подобного гликопротеина CA-125, которая распознается с помощью моноклональных антител. Впервые этот антиген был идентифицирован Bast et al. в 1981 г. и в настоящее время признан золотым стандартом в качестве онкомаркера рака яичников [5]. Время полувыведения антигена из сыворотки крови составляет 4,5 дня. В отличие от многих других онкомаркеров РЯ (CA-549, CASA, CA19-9, CA15-3, MCA, MOV-1, TAG-72) CA-125 в наибольшей степени обладает прогностической значимостью. Концентрация данного антигена в сыворотке крови коррелирует с опухолевой массой, а также опухолевой регрессией или прогрессией [14, 16, 20]. Учитывая эти факты, сопоставление количественного содержания исследуемых субпопуляций Treg с уровнем CA-125 могло бы выявить наличие или отсутствие какой-либо зависимости Treg с опухолевой массой. Другим подходом для анализа взаимосвязи между размером/характером роста опухоли и количественными изменениями Treg могла бы стать сравнительная оценка содержания этих клеток до и после хирургического удаления опухоли у больных с различным объемом оперативного вмешательства.

Исходя из сказанного, целью работы явилось исследование взаимосвязи между количественным содержанием различных субпопуляций Treg и сывороточным уровнем CA-125, а также анализ изменений Treg после хирургического удаления опухоли.

Материалы и методы

В исследование были включены 21 женщина с РЯ I-IV стадии в возрасте от 24 до 82 лет (в среднем 55,9±3,6 лет), обследованных двукратно до и через 14 дней после хирургического удаления опухоли. Диагноз РЯ был верифицирован на основе гистологического исследования. Обследование всех пациенток проводили после получения информированного согласия. Контрольную группу составили сопоставимые по возрасту 30 здоровых женщин — доноров крови. Концентрацию

СА-125 в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческой тест-системы СА-125-ИФА (ООО «Хема-Медика», Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. Относительное содержание $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток определяли методом проточной цитофлюориметрии на лазерном клеточном сортере-анализаторе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием фикоэретрин (PE)-меченных анти-CD4 моноклональных антител (МАТ, «Сорбент», Москва) и FITC-меченных анти-CD25 МАТ (BD PharMingen, США). Для оценки внутриклеточной экспрессии FoxP3⁺ в $CD4^+$ и в $CD8^+$ Т-клетках, МНК обрабатывали FITC-меченными анти-CD4 или анти-CD8 МАТ («Сорбент», Москва). Пермеабиллизацию клеток проводили с использованием 0,2% раствора Твин-20, после чего клетки культивировали 30 мин с PE-меченными анти-FoxP3⁺ антителами (eBioscience, США). Функциональную активность и сенсibilлизацию к опухолевым антигенам МНК оценивали по способности клеток пролиферировать в ответ на стимуляцию анти-CD3 антителами и опухолевыми антигенами (лизатом опухоли) в присутствии/отсутствии экзогенного IL-2. Для этого клетки в концентрации $0,1 \times 10^6$ /лунку культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в среде RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров АВ(II) группы крови при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Для стимуляции клеток использовали моноклональные анти-CD3 антитела ICO-90 (анти-CD3, «Медбиоспектр», Москва) в концентрации 1 мкг/мл, а также опухолевые антигены, содержащиеся в лизате аутологичных опухолевых клеток (0,1 мг/мл по белку) в присутствии/от-

сутствии IL-2 (50 Ед/мл, «Ронколейкин», СПб.). Лизат опухолевых клеток готовили из фрагмента опухоли, удаленной во время операции. Для этого опухолевую массу гомогенизировали с последующим 5-кратным замораживанием и размораживанием и оценкой концентрации белка в надосадочной жидкости. Интенсивность пролиферации оценивали через 72 ч по включению ³H-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, а также W-критерий Вилкоксона для связанных выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмана (r_s).

Результаты

Согласно данным литературы содержание СА-125 в сыворотке крови женщин с сохраненными репродуктивными органами не превышает 35 Ед/мл [3, 20]. В сформированной нами контрольной группе здоровых женщин данный показатель варьировал от 3,2 до 17 Ед/мл (в среднем $9,2 \pm 1$ Ед/мл, $n = 16$) и не выходил за верхнюю границу принятого нормативного диапазона. Концентрация СА-125 в сыворотке крови больных РЯ была в 16 раз выше и составляла 153 ± 24 Ед/мл ($n = 21$; $p_U = 0,00006$). При этом, несмотря на тенденцию к более высокому уровню СА-125 у больных с III-IV стадиями (163 ± 25 Ед/мл; $n = 17$) по сравнению с начальными I-II стадиями РЯ (117 ± 58 Ед/мл; $n = 4$; $p_U = 0,37$), прямой зависимости между концентрацией данного антигена и стадией заболевания не выявлялось ($r_s = 0,11$; $p = 0,65$). При индивидуальном анализе повышенная концентрация СА-125 в исследуемой группе отмечалась у 16 женщин. В то же время у 5 пациенток уровень СА-125 не превышал

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ Treg В КРОВИ БОЛЬНЫХ РЯ С НОРМАЛЬНЫМ И ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ СА-125

Субпопуляции Treg (%)	Доноры $n = 20$	Больные раком яичников	
		СА-125 < 35 Ед/мл $n = 5$	СА-125 > 35 Ед/мл $n = 16$
$CD4^+CD25^+$	$4,8 \pm 0,26$	$6,0 \pm 1,5$	$3,1 \pm 0,4$ ** #
$CD4^+CD25^{high}$	$1,3 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$ **
$CD4^+FoxP3^+$	$3,6 \pm 0,5$	$6,6 \pm 2,3$	$8,6 \pm 1,9$ **
$CD8^+FoxP3^+$	$6,4 \pm 1,2$	$8,8 \pm 2,1$	$19,6 \pm 5,3$ **

Примечание. Относительное количество $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^{high}$, $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ клеток представлено в виде $M \pm S.E.$, n – количество наблюдений. ** $p_U < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с показателями здоровых доноров; # $p_U < 0,05$ – достоверность различий между подгруппами женщин с РЯ (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

35 Ед/мл и составлял в среднем 14 ± 6 Ед/мл. В двух случаях это объяснялось неэпителиальным происхождением опухоли. Опухоли яичников трех других пациенток имели эпителиальное происхождение, однако, судя по отсутствию асцита характеризовались меньшей опухолевой массой.

Проведенные нами ранее исследования показали, что больные РЯ характеризуются сниженным количеством в периферической крови $CD4^+CD25^+/CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток и повышенным содержанием $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ Treg [1, 2]. Причем снижение субпопуляции $CD4^+CD25^+/D4^+CD25^{high}$ Treg в циркуляции ассоциировалось с достоверно более высоким уровнем этих клеток в асцитической жидкости, тогда как содержание $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ Т-клеток в периферической крови и асцитической жидкости не различалось. Учитывая эти факты и разнонаправленные изменения $CD4^+CD25^+/CD4^+CD25^{high}$ и $CD4^+FoxP3^+$ Т-клеток в периферической крови, мы предположили, что анализируемые клеточные субпопуляции могут быть представлены разными типами Treg. В частности, $CD4^+CD25^+/D4^+CD25^{high}$ клетки представляют естественные Treg, которые согласно данным литературы мигрируют в зону опухолевого микроокружения, тогда как $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ Т-клетки являются, по-видимому, индуцированными Treg, и их изменения носят системный характер [2].

Сравнение относительного содержания Treg у женщин с нормальным и повышенным уровнем СА-125 (табл. 1) показало, что характерные для больных РЯ изменения выявлялись только в подгруппе с повышенным уровнем СА-125 и не регистрировались в оппоритной группе. В частности, у женщин с нормальным уровнем СА-125

не отмечалось снижения в периферической крови $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток, а возрастание $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ Treg было менее выраженным и проявлялось лишь в виде тенденции. Таким образом, выявленные нами ранее изменения регуляторных клеток, характерные для РЯ, ассоциировались с повышенным содержанием в кровотоке опухолевых антигенов (СА-125).

Известно, что увеличение естественных Treg при опухолевом росте связано с увеличением концентрации ОАА, которые в своем составе содержат аутоантигенные детерминанты. Анализ взаимосвязи между концентрацией СА-125 и пролиферативным ответом МНК на стимуляцию опухолевыми антигенами в присутствии субоптимальных доз IL-2 выявил наличие прямой корреляционной связи между указанными параметрами ($r_s = 0,65$; $p = 0,022$). Это свидетельствует, что увеличение уровня СА-125 сопровождается появлением лимфоцитов, распознающих опухолевые антигены (в том числе несущие аутоантигенные детерминанты), что может индуцировать генерацию Treg. Действительно, несмотря на сниженное количество естественных Treg в крови женщин с высоким уровнем СА-125, между абсолютным количеством $CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток и концентрацией СА-125 выявлялась прямая корреляционная зависимость ($r_s = 0,65$; $p = 0,026$). В то же время относительное и абсолютное количество $CD4^+FoxP3^+$ Т-клеток не коррелировало с концентрацией СА-125 ($r_s = -0,27$; $p = 0,32$ и $r_s = 0,02$; $p = 0,98$ соответственно). Что касается $CD8^+FoxP3^+$ клеток, их абсолютное и относительное содержание находилось в обратной корреляционной зависимости от уровня СА-125 ($r_s = -0,67$; $p = 0,07$ и $r_s = -0,73$; $p = 0,026$ соответственно).

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ РЯ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ОБЪЕМУ ОПЕРАТИВНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Анализируемые параметры		Подгруппа 1, n = 9 (оптимальная циторедуктивная операция)	Подгруппа 2, n = 7 (частичная циторедуктивная операция)
Возраст (лет)		55,4±5,2	63,8±3,5
Стадия заболевания			
I стадия		1	0
II стадия		0	1
III стадия		8	4
IV стадия		0	2
Гистологический тип			
- эпителиального происхождения		9	6
- неэпителиального происхождения		0	1
Уровень СА-125 (Ед/мл)	до операции	164±25	242±29 *
	после операции	94±15 #	155±37 #

Примечание. * – $p_0 < 0,05$ - достоверность различий между подгруппами; # $p_0 < 0,05$ - достоверность различий до и после операции (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

Чтобы проанализировать, влияет ли изменение опухолевой массы на содержание регуляторных Т-клеток, мы также сравнили количество различных субпопуляций Treg до и после оперативного лечения. Согласно данным литературы хирургическое удаление опухоли сопровождается выраженным снижением уровня СА-125, что наиболее четко проявляется к концу 4 недели [8]. В наших исследованиях повторное обследование проводилось в более ранние сроки в связи с началом курса химиотерапии через 2 недели после операции. К этому сроку сывороточная концентрация СА-125 снижалась практически в 2 раза, составляя в среднем 121 ± 19 Ед/мл против $198 \pm 19,6$ Ед/мл в предоперационном периоде ($p_U = 0,001$, $n = 16$). Важно отметить, что по объему оперативного вмешательства женщины разделились на 2 подгруппы. Первую составили девять пациенток, которым удалось провести оптимальную циторедуктивную операцию с максимально полным удалением опухолевого субстрата. Во вторую подгруппу вошли 7 женщин, которым была выполнена частичная циторедуктивная операция в связи с прорастанием опухоли в окружающие ткани. Эти женщины в отличие от первой подгруппы характеризовались наличием остаточного объема опухолевой ткани.

Сформировавшиеся подгруппы женщин были сопоставимы по возрасту, стадиям заболевания и гистологическому типу опухоли (табл. 2). Тем не менее, концентрация СА-125 во второй подгруппе была достоверно выше, чем в первой. Это не было связано с присутствием во второй подгруппе больных с IV стадией, поскольку достоверные различия сохранялись также при сравнении женщин, имеющих III стадию РЯ ($274 \pm 9,7$ против 168 ± 21 Ед/мл; $p_U = 0,008$). Учитывая, что больные 2 подгруппы характеризовались прорастанием опухоли в окружающие ткани, можно полагать, что увеличение сывороточной концентрации СА-125 детерминировано не столько размерами опухоли, сколько инвазивным харак-

тером ее роста. Значимое снижение уровня антигена в послеоперационном периоде наблюдалось в обеих подгруппах. Однако концентрация СА-125 у женщин, которым была выполнена частичная циторедуктивная операция, оставалась на сравнительно высоком уровне, сопоставимом с исходными значениями СА-125 у больных первой подгруппы.

Исходное количество $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^{high}$ клеток не отличалось у женщин, опозитных по объему оперативного вмешательства, что также свидетельствует о сопоставимости подгрупп. Однако динамика изменений Treg в послеоперационном периоде существенно различалась (табл. 3). Так, у пациенток 1 подгруппы наблюдалось значимое возрастание в периферической крови абсолютного количества $CD4^+CD25^+$ Т-клеток (с 44 ± 11 до 110 ± 24 клеток/мкл; $p_W = 0,046$) и выраженная тенденция к увеличению относительного содержания $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^{high}$ клеток (в 1,9 и 2,3 раза, соответственно). В то же время у пациенток с остаточным объемом опухолевой ткани количество $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток в периферической крови оставалось на исходно низком уровне и значимо отличалось от показателей в опозитной подгруппе ($p_U < 0,05$).

Исходное содержание $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ клеток у больных РЯ в исследуемых группах не различалось. При этом удаление опухоли не сказывалось значимо на количестве этих клеток, и их содержание после операции оставалось одинаково повышенным как в группе с оптимальным, так и частичным оперативным вмешательством.

Таким образом, изменения количественного содержания Treg после хирургического удаления опухоли наблюдались только в отношении естественных $CD4^+CD25^+/CD4^+CD25^{high}$ Treg. Эти изменения регистрировались у больных с условно радикальным удалением опухолевого субстрата и проявлялись увеличением количества данных

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ Treg В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ БОЛЬНЫХ РЯ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ОБЪЕМУ ОПЕРАТИВНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Субпопуляции Treg	Подгруппа 1, n = 9 (оптимальная циторедуктивная операция)		Подгруппа 2, n = 7 (частичная циторедуктивная операция)	
	Исходно	После операции	Исходно	После операции
$CD4^+CD25^+$ (%)	$3,2 \pm 0,58$	$6,2 \pm 1,3$	$2,8 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,7 \#$
$CD4^+CD25^+$ ($10^9/\mu$)	44 ± 10	$110 \pm 24^*$	$52 \pm 8,7$	96 ± 30
$CD4^+CD25^{high}$ (%)	$0,74 \pm 0,17$	$1,6 \pm 0,45$	$0,8 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,2 \#$
$CD4^+FoxP3^+$ (%)	$6,3 \pm 1,3$	$7,1 \pm 1,2$	$7,6 \pm 2,3$	$7,0 \pm 1,7$
$CD8^+FoxP3^+$ (%)	$16,0 \pm 3,6$	$15,0 \pm 2,6$	$19 \pm 7,5$	$15,5 \pm 4,2$

Примечание. * $p_W < 0,05$ – достоверность различий до и после операции; # $p_U < 0,05$ – достоверность различий между подгруппами после операции (W – критерий Вилкоксона для связанных выборок и U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

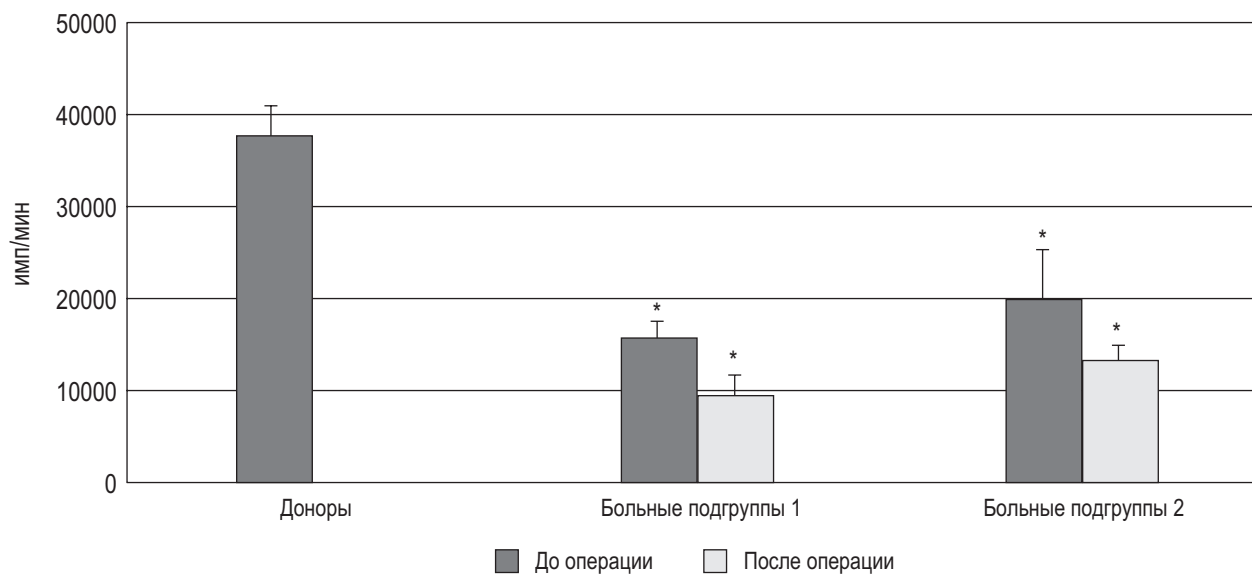


Рисунок 1. Анти-CD3-стимулированный пролиферативный ответ МНК здоровых доноров и больных РЯ, различающихся по объему оперативного вмешательства

Примечание. По оси ординат представлены средние значения ($M \pm S.E.$) анти-CD3-стимулированной пролиферации МНК здоровых доноров ($n = 30$) и больных РЯ. Подгруппа 1 ($n = 9$) – больные с оптимальной и подгруппа 2 ($n = 7$) – с частичной циторедуктивной операций. * – $p_u < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с донорами (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

клеток в крови больных. Поскольку у женщин с остаточным объемом опухолевой ткани подобной динамики Treg не наблюдалось, можно полагать, что выявленные в послеоперационном периоде различия, обусловлены исключительно наличием или отсутствием остаточной опухолевой массы, способной поддерживать направленную миграцию естественных Treg из циркуляции в опухолевое микроокружение. Что же касается субпопуляций $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ T-клеток, уровень которых после операции оставался таким же повышенным, как и до операции, эти клетки, по-видимому, обладают меньшей способностью к направленной миграции в опухолевый очаг, и поэтому их уровень не зависит от остаточного объема опухоли в послеоперационном периоде.

Повышенное содержание $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ Treg в послеоперационном периоде может выступать в качестве одного из возможных механизмов иммуносупрессии у больных РЯ. Действительно, оценка интенсивности пролиферации МНК в ответ на стимуляцию анти-CD3-антителами показала (рис. 1), что как исходно, так и через 2 недели после операции больные РЯ вне зависимости от объема оперативного вмешательства, характеризовались глубоким угнетением функциональной активности T-клеток.

Обсуждение

Согласно данным литературы увеличение Treg в опухолевом микроокружении и системном кро-

вотоке выявляется при многих злокачественных заболеваниях [6, 10, 27]. Поскольку увеличение регуляторных T-клеток обусловлено появлением опухолево-ассоциированных антигенов и возрастанием уровня иммуносупрессивных цитокинов/хемокинов, продуцируемых самими опухолевыми клетками, количество и характер распределения Treg в определенной степени могут быть связаны с размерами опухолевой массы. С другой стороны, можно полагать, что количество Treg после хирургического удаления опухоли может снижаться. Так, Tokuno K. с соавт. выявили, что удаление опухоли у больных раком желудка I стадии сопровождается нормализацией исходно повышенного уровня $CD4^+FoxP3^+$ Treg [23]. Аналогичные данные были получены Kono K. с соавт., которые продемонстрировали снижение количества $CD4^+CD25^{high}$ T-клеток у больных раком желудка после оперативного лечения [19].

Проведенные в настоящей работе исследования показали, что изменения Treg в периферической крови больных РЯ также имеют отношение к размерам опухолевого субстрата. На это указывает выявленная нами прямая достоверная взаимосвязь между абсолютным количеством циркулирующих $CD4^+CD25^{high}$ Treg и уровнем CA-125, а также отсутствие изменений Treg в периферической крови больных РЯ с нормальным уровнем CA-125. Кроме того, как показали наши исследования, условно радикальное удаление опухолевого субстрата у женщин с оптимальной циторедуктивной операцией сопровождалось увеличением в периферической крови исходно сниженного

количества $CD4^+CD25^+/CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток до нормативного уровня, тогда как у больных с остаточной опухолевой массой этого не наблюдалось. Поскольку рекрутирование Treg в зону опухолевого роста обусловлено действием хемокинов, продуцируемых опухолевыми клетками, можно полагать, что радикальное удаление опухоли обуславливает прекращение миграции естественных Treg из периферической крови. В то же время у больных с неоптимальной циторедуктивной операцией остаточная опухолевая масса поддерживает миграцию естественных Treg в брюшную полость.

Что же касается $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ Treg, достоверное увеличение этих клеток, так же как и $CD4^+CD25^+/CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток отмечалось только у больных с повышенным уровнем СА-125 и не выявлялось у пациентов с нормальным содержанием данного ОАА. Тем не менее, возрастание СА-125 не было сопряжено с увеличением количества этих клеток. Напротив, численность $CD8^+FoxP3^+$ находилась в обратной корреляционной связи с уровнем СА-125. При этом хирургическое удаление опухолевого субстрата не приводило к изменению содержания указанных клеток в циркуляции. Транскрипционный фактор FoxP3 считается специфическим маркером регуляторных Т-клеток. Учитывая, что большая часть $CD4^+FoxP3^+$ не экспрессирует CD25 [1], можно полагать, что данная субпопуляция представляет индуцированные Treg, образующиеся из CD25-негативных Т-клеток. Действительно, увеличение $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ Т-клеток было обнаружено у больных системной красной волчанкой. Причем функциональные исследования этих клеток показали, что они ингибируют пролиферацию Т-лимфоцитов, но не подавляют продукции $IFN\gamma$ [7]. Кроме того, нельзя исключить, что часть $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ Т-клеток является активированными лимфоцитами, поскольку Foxp3 может кратковременно экспрессироваться на определенных этапах активации эффекторных Т-лимфоцитов [4]. Однако низкая пролиферативная активность периферических Т-клеток как до, так и спустя 2 недели после операции на фоне сохраняющегося повышенного содержания $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ является косвенным аргументом, склоняющим в пользу принадлежности этих клеток к популяции Treg.

Хирургическому удалению опухоли в последнее время придается особое значение не только как методу радикального или частичного уменьшения объема опухолевой массы, но и методу прерывания иммунологической толерантности опухоли вследствие элиминации содержащихся в опухоли Treg [15]. Экспериментальным под-

тверждением этого являются данные о регрессии опухоли после удаления у мышей популяции регуляторных $CD4^+CD25^+$ Т-лимфоцитов [22]. Полученные нами данные позволяют предположить, что радикальное удаление опухоли у больных РЯ останавливает направленную миграцию Treg, однако не приводит к снижению в периферической крови $CD4^+FoxP3^+$ и $CD8^+FoxP3^+$ Т-клеток и восстановлению функциональной реактивности Т-лимфоцитов в ответ на анти-CD3-стимуляцию. Эти факты отчасти объясняют низкую эффективность изолированного оперативного лечения больных РЯ, а с другой стороны – обосновывают важность проведения дальнейшей циторедуктивной химиотерапии после хирургического удаления опухоли.

Список литературы

1. Курганова Е.В., Тихонова М.А., Коваленко В.Ф., Лебедева В.А., Ласкавая Е.Г., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика регуляторных Т-клеток у больных раком яичника // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № 6 (30). – С. 40-45.
2. Курганова Е.В., Тихонова М.А., Ласкавая Е.Г., Лебедева В.А., Звездина Н.Ю., Безбородова В.И., Гончаров М.А., Лебедева В.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Регуляторные Т-клетки при доброкачественных и злокачественных опухолях яичников // Иммунология. – 2009. – № 6. – С. 349-355.
3. Сергеева Н.С., Ермошина Н.В., Мишурнина М.П. Использование опухолеассоциированных маркеров для диагностики и контроля за эффективностью терапии у больных с распространенным раком яичников // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2002.
4. Allan S.E., Crome S.Q., Crellin N.K., Passerini L., Steiner T.S., Vacchetta R., Roncarolo M.G., Levings M.K. Activation-induced FoxP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production // Intern. Immunol. – 2007. – Vol. 19. – P. 345-354.
5. Bast R.S., Feeney M., Lazarus H., Nadler L.M., Colvin R.B., Knapp R.C. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma // J. Clin. Invest. – 1981. – Vol. 68. – P. 1331-1337.
6. Beyer M., Schultze J.L. Regulatory T cells in cancer // Blood. – 2006. – Vol. 108, № 3. – P. 804-811.
7. Bonelli M., Savitskaya A., Steiner C.-W., Rath E., Smolen J.S., Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ T cells in patients with systemic lupus erythematosus // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182. – P. 1689-1695.
8. Canney P.A., Moore M., Wilkinson P.M., James R.D. Ovarian cancer antigen CA-125: a

prospective clinical assessment of its role of a tumor marker // Br. J. Cancer. – 1984. – Vol. 50, N 6. – P. 765-769.

9. Chaput N., Louafi S., Bardier A., Charlotte F., Vaillant J-C., Menegaux F., Rosenzweig M., Lemoine F., Klatzmann D., Taieb J. Identification of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ suppressive T cells in colorectal cancer tissue // Gut. – 2009. – Vol. 58, N 4. – P. 520-529.

10. Chattopadhyay S., Chakraborty N.G., Mukherji B. Regulatory T cells and tumor immunity // Can. Immunol. Immunother. – 2005. – Vol. 54. – P. 1153 – 1161.

11. Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., McGrady G., Wahl S.M. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor FoxP3 // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 198. – P. 1875-1886.

12. Curiel T.J., Coukos G., Zou L., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Evdemon-Hogan M., Conejo-Garcia J.R., Zhang L., Burow M., Zhu Y., Wei S., Kryczek I., Daniel B., Gordon A., Myers L., Lackner A., Disis M.L., Knutson K.L., Chen L., Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival // Nat. Med. – 2004. – Vol. 10, N 9. – P. 942-949.

13. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells // Nat. Immunol. – 2003. – Vol. 4. – P. 330-336.

14. Gadducci A., Cosio S., Tana R., Genazzani A.R. Serum and tissue biomarkers as predictive and prognostic variables in epithelial ovarian cancer // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2009. – Vol. 69, N 1. – P. 12-27.

15. Gonzalez H.D., Figueras J. Effect of surgical resection of metastatic disease on immune tolerance to cancer. How a systemic disease could be controlled by a local therapy // Clin. Transl. Oncol. – 2007. – Vol. 9. – P. 571-577.

16. Gupta D., Lis C.G. Role of CA-125 in predicting ovarian cancer survival – a review of the epidemiological literature // J. Ovarian. Res. – 2009. – Vol. 2: 13 (BioMed Central <http://www.ovarianresearch.com/content/2/1/13>).

17. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 // Science. – 2003. – Vol. 299. – P. 1057-1061.

18. Jonuleit H., Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. // J. Immunol. – 2003. – Vol. 171. – P. 6323-6327.

19. Kono K., Kawaida H., Takahashi A., Sugai H., Mimura K., Miyagawa N., Omata H., Fujii H. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers // Cancer Immunol. Immunother. – 2006. – Vol. 55, N. 9. – P. 1064-1071.

20. M nstedt K., Krisch M., Sachsse S., Vahrson H. Serum CA-125 levels and survival in advanced ovarian cancer // Arch. Gynecol. Obstet. – 1997. – Vol. 259. – P. 117-123

21. Shafer-Weaver K.A., Anderson M.J., Stagliano R., Malyguine A., Greenberg N.M., Hurwitz A.A Tumor-specific CD8⁺ T cells infiltrating prostatic tumors are induced to become suppressor cells // J. Immunol. – 2009. – Vol. 183, N 8. – P. 4848-4852.

22. Shimizu J., Yamazaki S., Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells a common basis between tumor immunity and autoimmunity // J. Immunol. – 1999. – Vol. 163. – P. 5211- 5218.

23. Tokuno K., Hazama S., Yoshino S., Yoshida S., Oka M. Increased prevalence of regulatory T-cells in the peripheral blood of patients with gastrointestinal cancer // Anticancer Res. – 2009. – Vol. 29, N 5. – P. 1527-1532.

24. Walker M. R., Carson B.D., Nepom G.T., Ziegler S.F., Buckner J.H. De novo generation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human CD4⁺CD25⁻ cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 4103-4108.

25. Wei S., Kryczek I., Zou W. Regulatory T-cells compartmentalization and trafficking // Blood. – 2006. – Vol. 108. – P. 426-431.

26. Zhou G., Levitsky H.I. Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance // J. Immunol. – 2007.-Vol. 178. – P. 2155-2162.

27. Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy // Nat. Rev. Immunol. – 2006. – Vol. 6. – P. 295-307.

поступила в редакцию 31.03.2010

отправлена на доработку 19.04.2010

принята к печати 22.04.2010