

УДК: 612.422:612.017.1:616-006.6:616.37-002

АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ПАТОЛОГИЯХ, СОПРОВОЖДАЮЩИХСЯ РАЗВИТИЕМ ИММУННОЙ СУПРЕССИИ

**Г. А. Жулай¹, Е. К. Олейник¹, П. Н. Кравченко¹, А. В. Чуров¹,
В. М. Олейник¹, А. В. Головин², В. А. Толлер³, К. А. Островский⁴,**

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² ГБУЗ Республиканский онкологический диспансер

³ ГБУЗ Больница скорой медицинской помощи,

⁴ НУЗ Отделенческая клиническая больница на ст. Петрозаводск

Проведена оценка изменений клеточного иммунитета у лиц с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), патогенез которых сопровождается формированием иммунной супрессии: больные колоректальным раком (КРР, n = 20) и больные тяжелым острым панкреатитом (ОП, n = 16). Контрольную группу составили 14 здоровых доноров. У больных были отмечены признаки развития вторичного иммунодефицита, снижено содержание некоторых популяций лимфоцитов по сравнению с контролем. Показан сдвиг иммунорегуляторного индекса в сторону его снижения. Интересно отметить, что и при развитии КРР, и при ОП у больных было повышено содержание периферических CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ регуляторных Т-клеток (Treg) по сравнению с контролем.

К л ю ч е в ы е с л о в а: лимфоциты, Treg-клетки, FOXP3, колоректальный рак, острый панкреатит, иммунная супрессия.

**G. A. Zhulai, E. K. Oleinik, P. N. Kravchenko, A. V. Churov, V. M. Oleinik,
A. V. Golovin, V. A. Toller, K. A. Ostrovskii. ANALYSIS OF CELLULAR
IMMUNITY IN PATHOLOGIES ACCOMPANIED BY THE DEVELOPMENT OF
IMMUNE SUPPRESSION**

Changes in cellular immunity in patients with gastrointestinal diseases, where the pathogenesis is accompanied by the formation of immune suppression: patients with colorectal cancer (CRC, n = 20) and patients with severe acute pancreatitis (AP, n = 16), were assessed. The control group consisted of 14 healthy donors. Indications of a developing secondary immunodeficiency were observed in patients. The content of some lymphocyte subsets was reduced in comparison with the control. The immunoregulatory index shifted downwards. It is noteworthy that the content of peripheral CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg cells in both CRC and AP patients increased in comparison with the control.

K e y w o r d s: lymphocytes, Treg cells, FOXP3, colorectal cancer, acute pancreatitis, immune suppression.

Введение

К настоящему времени установлено, что развитие и элиминация любого патологического процесса в организме происходит с участием механизмов иммунологической защиты. Одним из таких механизмов является индукция иммунной супрессии опухолевыми клетками при канцерогенезе. Известно, что опухоль и ее микроокружение способны привлекать различные клетки иммунной системы, изменять их функции и фенотип и стимулировать продукцию ряда супрессорных факторов для ускользания от адекватной противоопухолевой иммунной реакции [Бережная, 2009]. Особую роль в этом отношении отводят популяции Treg-клеток, которые в норме поддерживают иммунологическую толерантность к собственным антигенам посредством подавления функций широкого ряда иммунокомпетентных клеток [Sakaguchi et al., 2010].

В вопросе взаимодействия иммунной системы и опухоли активно исследуются лимфоидные клетки, инфильтрирующие микроокружение опухоли, однако данных, характеризующих состояние периферических лимфоцитов, мало. Исследование особенности распределения системы циркулирующих лимфоцитов у онкологических больных, в частности Treg-клеток, представляется интересным в сравнении с другой патологией, также сопровождающейся развитием иммунной супрессии. В данной работе предлагается рассмотреть основные популяции лимфоцитов и Treg-клетки у лиц с патологией ЖКТ: больных КРР и больных ОП.

ОП характеризуется воспалением поджелудочной железы с возможным вовлечением перипанкреатических тканей и формированием полиорганной функциональной недостаточности, которая в свою очередь может возникать вследствие панкреонекроза, присутствия инфекции или сепсиса [Mofleh, 2008]. Последние исследования демонстрируют, что развитие ОП тесно связано с нарушением равновесия в иммунных механизмах, особенно в регуляции Т-хелперов (Th)1/Th2 и секреции ими цитокинов. Было показано, что тяжелый ОП сопровождается индукцией иммунной супрессии, которая может

способствовать развитию вторичной инфекции и ухудшать состояние больного [Li et al., 2013; Ueda et al., 2006]. Однако данных о содержании и функционировании Treg-клеток у больных ОП в литературе немного. Поэтому целью настоящей работы являлось сравнительное изучение популяций периферических лимфоцитов, в частности Treg-клеток, у больных КРР и ОП.

Материалы и методы

В работе исследовано 50 образцов периферической крови человека. Группу больных с тяжелым ОП составили 16 человек в возрасте от 22 до 83 лет, среди которых 7 больных имели деструктивную форму (табл.). Диагноз поставлен на основе классификации, принятой на IX Всероссийском съезде хирургов в 2000 году. Забор крови осуществляли на 1–10-е сутки после поступления на лечение, до оперативного вмешательства. В группу больных КРР вошли 20 человек в возрасте от 44 до 83 лет на разных стадиях развития опухоли (см. табл.). Забор крови проводили также до хирургического вмешательства. Контрольную группу составили 14 здоровых доноров в возрасте от 25 до 65 лет. Анализ содержания основных популяций лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500, с применением программного обеспечения СХР 2.0 («Beckman Coulter», США). Для оценки экспрессии клетками мембранных маркеров использовали моноклональные антитела CD3-PE, CD19-FITC, CD16-FITC (ООО «Сорбент», Москва), CD4-FITC, CD8-FITC, CD25-PC5 («Beckman Coulter», Франция). Определение Treg-клеток осуществляли по фенотипу CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, с использованием моноклональных антител к FOXP3 и растворов для пермеабиллизации производства «eBioscience», США. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «BioStat 5.8.4», достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

Исследование выполнено с применением оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Характеристика обследованных групп

	Здоровые доноры	Больные острым панкреатитом	Больные колоректальным раком
Количество обследованных лиц	14	16	20
Средний возраст, лет	40,8 ± 13	44,8 ± 17	66,8 ± 10
Пол, мужчины/женщины	5/8	13/3	7/13
Развитие панкреонекроза, n	–	7 (43,8 %)	–
Развитие опухоли, n			
I-II стадии	–	–	7 (35 %)
III стадия	–	–	6 (30 %)
IV стадия	–	–	7 (35 %)

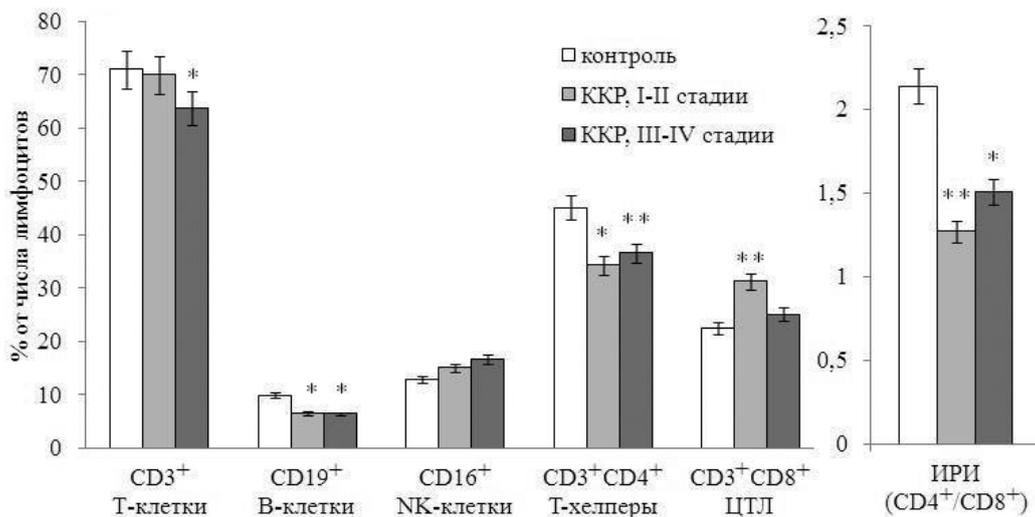


Рис. 1. Содержание популяций лимфоцитов в периферической крови больных колоректальным раком на разных стадиях болезни, % от общего числа лимфоцитов.

Здесь и далее: * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$; ** – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,01$

Результаты и обсуждение

Для определения изменений, происходящих в клеточном иммунитете у больных с исследуемыми заболеваниями ЖКТ, было проанализировано относительное количество $CD3^+$ Т-лимфоцитов, $CD19^+CD3^-$ В-лимфоцитов и $CD16^+CD3^-$ натуральных киллеров (NK). Также была проведена оценка субпопуляций Т-клеток: Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, $CD3^+CD8^+$). Было показано, что у больных КРР по сравнению с контролем снижено число В-лимфоцитов (рис. 1).

Количество циркулирующих Т-лимфоцитов у больных КРР на начальных стадиях развития опухоли (I-II стадии) не отличалось от контроля, тогда как у больных с III-IV стадиями КРР Т-клеток было меньше. В отношении NK-клеток у больных КРР намечена тенденция к увеличению их количества при прогрессии заболевания, однако достоверных различий по сравнению с контролем не выявлено. Значительные изменения наблюдались в субпопуляционном составе Т-клеток. Так, иммунорегуляторный индекс (ИРИ), отражающий баланс $CD4^+/CD8^+$ Т-клеток, у больных КРР был ниже контрольных значений. Причем на начальных стадиях развития опухоли его снижение происходило за счет меньшего числа $CD4^+$ Т-хелперов и повышенного количества $CD8^+$ ЦТЛ. Увеличение относительного числа $CD8^+$ Т-клеток может выявляться в случаях массивного поступления антигена, в том числе и онкогена, когда в его элиминации задействованы антигенспецифические механизмы. К тому же именно цитотоксическая активность $CD8^+$

Т-клеток играет важную роль в противоопухолевом иммунном ответе [Ling et al., 2007]. При исследовании периферических $CD8^+$ Т-клеток на более поздних стадиях заболевания нами показано, что их содержание было на уровне нормы (см. рис. 1). Однако ИРИ у таких больных также оставался ниже контроля в основном за счет значительного уменьшения числа $CD4^+$ Т-клеток. При этом у больных КРР наблюдалось сниженное по сравнению с контролем содержание активированных $CD4^+CD25^+$ Т-клеток на всех стадиях развития болезни (рис. 2). Полученные данные, а также литературные сведения [Seretis et al., 2014] свидетельствуют о том, что у больных КРР в процессе канцерогенеза происходит ослабление иммунной реакции, что может способствовать прогрессии болезни.

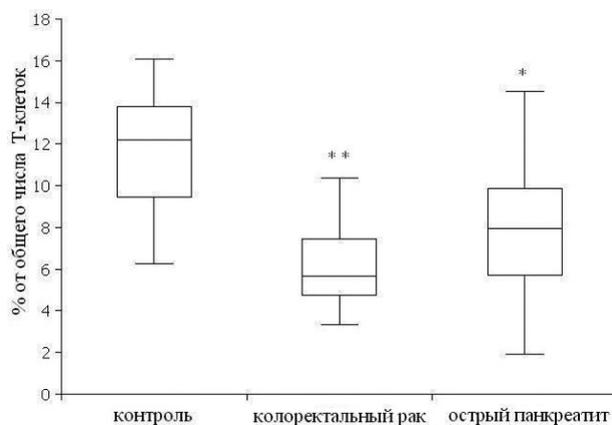


Рис. 2. Содержание активированных $CD4^+CD25^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови больных КРР и ОП, % от общего числа лимфоцитов

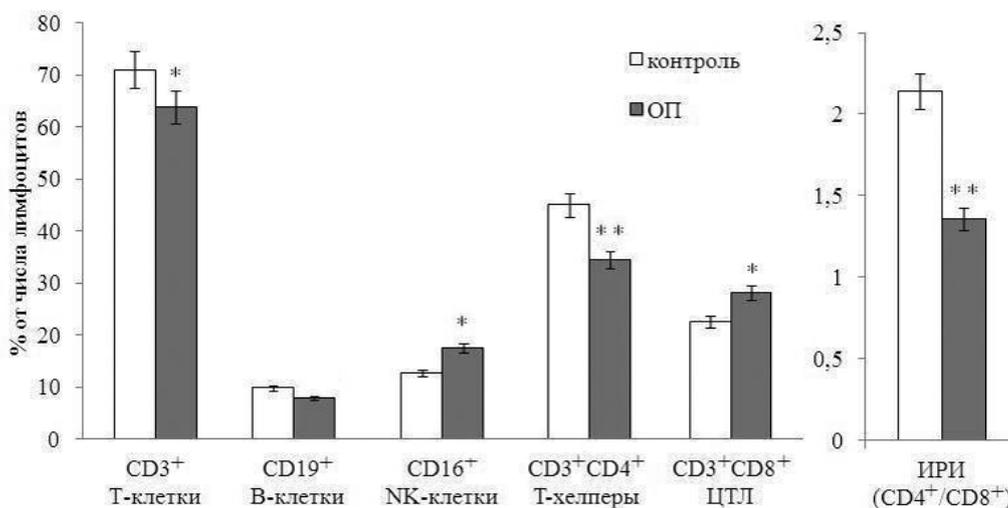


Рис. 3. Содержание популяций лимфоцитов в периферической крови больных острым панкреатитом, % от общего числа лимфоцитов

У обследованных больных ОП также наблюдались признаки вторичного иммунодефицита. Было показано, что содержание Т-лимфоцитов и CD4⁺ Т-клеток ниже, чем в контроле (рис. 3). Количество активированных Т-хелперов также было снижено по сравнению с таковым у здоровых доноров (см. рис. 2). Изменения в соотношении субпопуляций Т-клеток отразились в значительном снижении ИРИ. Отмечено, что наряду с увеличенным числом CD8⁺ ЦТЛ у больных ОП было повышено содержание NK-клеток по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать о том, что в иммунную реакцию при ОП включаются и специфические, и неспецифические механизмы элиминации антигена.

Природа иммунной недостаточности при остром панкреатите кроется в нарушении баланса продукции цитокинов Th1 и Th2, что приводит к их одновременной гиперпродукции. Это влечет за собой запуск каскада реакций, приводящих к чрезмерному иммунному ответу. При развитии заболевания усиленная активация иммунокомпетентных клеток сменяется увеличением уровня апоптоза периферических лимфоцитов, что, вероятно, и приводит к снижению их количества [Zhang et al., 2009]. Снижение числа циркулирующих Т- и В-лимфоцитов у больных ОП отмечается и в работах других авторов [Pietruczuk et al., 2006; Ueda et al., 2006; Li et al., 2013].

При анализе содержания Treg-клеток у больных КРП было обнаружено, что число периферических CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток у больных (n = 20) выше, чем в контроле (5,31 ± 2,7 % и 3,41 ± 0,8 % от CD4⁺ Т-клеток соответственно, p < 0,01). Многие авторы

демонстрируют повышенное количество Treg-клеток у онкологических больных, причем отмечено, что накопление этих субпопуляций происходит в микроокружении опухоли и дренирующих опухоль лимфатических узлах, где их число в несколько раз превышает число периферических Treg-клеток [Salama et al., 2009; Seretis et al., 2014]. Предполагается, что привлечение и стимуляция Treg-лимфоцитов опухолевыми клетками способствует формированию иммунной супрессии, которая рассматривается в качестве одного из важных механизмов уклонения от противоопухолевого иммунного ответа [Yang, Ansell, 2009].

Интересно отметить, что при анализе содержания Treg-клеток у больных ОП (n = 7) также было обнаружено, что их количество в периферической крови выше (7,71 ± 2,1 % от CD4⁺ Т-клеток, p < 0,01), чем в контроле. Увеличение числа циркулирующих Treg-клеток у больных ОП показали также Li J. P. с соавт. при изучении развития иммунной супрессии по мере прогрессирования заболевания [Li et al., 2013]. Учитывая повышенное содержание Treg-клеток, а также воспалительный характер заболевания и увеличение уровня апоптоза циркулирующих лимфоцитов [Zang et al., 2009], можно предположить, что развитие состояния иммунной супрессии у таких больных происходит как компенсаторный механизм, ограничивающий степень развития воспалительной реакции.

Заключение

В результате исследования двух патологий ЖКТ было показано, что при развитии

KPP и ОП происходят изменения в популяционном составе лимфоцитов периферической крови, приводящие к ослаблению иммунного ответа. Эти заболевания имеют разный генез и механизмы формирования, однако их развитие сопровождается иммунной супрессией, при которой происходит активация популяции Трег-клеток, что, по всей видимости, играет немаловажную роль в патогенезе как KPP, так и ОП. Исследования Трег-клеток у таких больных позволят выявить ключевые моменты их регуляторных функций при развитии иммунной супрессии, что в свою очередь позволит найти более эффективные мишени для иммунотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-98826).

Литература

Бережная Н. М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины – участники воспаления // Онкология. 2009. Т. 11, № 1. С. 6–17.

Li J. P., Yang J., Huang J. R. et al. Immunosuppression and the infection in patients with early SAP // Front Biosci. (Landmark Ed). 2013. Vol. 18. P. 892–900.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Жулай Галина Анатольевна

младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: zhgali-111@rambler.ru
тел.: (8142) 769810

Олейник Евгения Константиновна

руководитель группы иммунологии, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: ole@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Кравченко Полина Николаевна

аспирант
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: k-polina13@mail.ru
тел.: (8142) 769810

Чуров Алексей Викторович

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: achurou@yandex.ru
тел.: (8142) 769810

Ling K. L., Prata S. E., Bates G. J., Singh B. et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients // Cancer Immun. 2007. Vol. 7, N 7.

Mofleh I. A. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors // World J. Gastroenterol. 2008. Vol. 14. P. 675–684.

Pietruczuk M., Dabrowska M. I., Wereszczynska-Siemiakowska U. et al. Alteration of peripheral blood lymphocyte subsets in acute pancreatitis // World J. Gastroenterol. 2006. Vol. 12. P. 5344–5351.

Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Hafler D. A. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system // Nat. Rev. Immunol. 2010. Vol. 10. P. 490–500.

Salama P., Phillips M., Grieu F., Morris M. et al. Tumor-infiltrating FOXP3⁺ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer // J. Clin. Oncol. 2009. Vol. 27. P. 186–192.

Seretis F., Seretis C., Youssef H., Chapman M. Colorectal cancer: seed and soil hypothesis revisited // Anticancer Res. 2014. Vol. 34, N 5. P. 2087–2094.

Ueda T., Takeyama Y., Yasuda T., Shinzaki M. et al. Immunosuppression in patients with severe acute pancreatitis // J. Gastroenterol. 2006. Vol. 41. P. 779–784.

Yang Z. Z., Ansell S. M. The role of Treg cells in the cancer immunological response // Am. J. Immunol. 2009. Vol. 5, N 1. P. 17–28.

Zhang X. P., Chen H. Q., Liu F., Zhang J. Advances in researches on the immune dysregulation and therapy of severe acute pancreatitis // J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2009. Vol. 10, N 7. P. 493–498.

Zhulai, Galina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: zhgali-111@rambler.ru
tel.: (8142) 769810

Oleinik, Evgenia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ole@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Kravchenko, Polina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: k-polina13@mail.ru
tel.: (8142) 769810

Churov, Alexei

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: achurou@yandex.ru
tel.: (8142) 769810

Олейник Виктор Михайлович

старший научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: scigraph@yandex.ru
тел.: (8142) 769810

Головин Андрей Викторович

врач хирург-онколог
ГБУЗ Республиканский онкологический диспансер
Лососинское ш., 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185002
эл. адрес: ya-pomorin@yandex.ru
тел.: (8142) 764235

Толлер Виктор Артурович

врач-колопроктолог
ГБУЗ Больница скорой медицинской помощи
ул. Кирова, 40, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185031
эл. адрес: vtoller@yandex.ru
тел.: (8142) 766253

Островский Константин Адольфович

врач-ординатор, к. м. н.
НУЗ Отделенческая клиническая больница
на ст. Петрозаводск
пр. Первомайский, 17, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185001
эл. адрес: aost2@mail.ru
тел.: (8142) 714677

Oleinik, Victor

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: scigraph@yandex.ru
tel.: (8142) 769810

Golovin, Andrey

Republican Oncology Center
11 Lososinskaya St., 185002 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ya-pomorin@yandex.ru
tel.: (8142) 764235

Toller, Victor

Hospital of Emergency Care
40 Kirova St., 185031 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: vtoller@yandex.ru
tel.: (8142) 766253

Ostrovskii, Konstantin

Department of clinical hospital at station Petrozavodsk,
17 Pervomaiskaya St., 185001 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: aost2@mail.ru
tel.: (8142) 714677