

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ В ДО- И ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE IMMUNE STATUS OF PATIENTS WITH BLADDER CANCER IN THE PRE- AND POSTOPERATIVE PERIOD

**Yu. Alyaev
V. Grigoryan
R. Ataullakhanov
E. Shpot
T. Soblirov**

Summary. The results of the comparative analysis of patients with bladder cancer in pre- and postoperative period. It is found that reducing the degree of differentiation of cancer of the bladder to moderate the high increases the number of activated HLA-DR + CD8 + T cells, while reducing the triple perforin content in these cells. These changes indicate a lengthy immune response reflecting early relapse or nonradical surgery.

Keywords: bladder cancer, immune status, HLA-DR + CD8 + T cells, postoperative relapse, perforin.

Аляев Юрий Геннадьевич

Д.м.н., профессор, Член-корреспондент РАМН, Директор клиники урологии им. Р.М. Фронштейна Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Зам. директора НИИ Уронефрологии и репродуктивного здоровья человека Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Заведующий кафедрой урологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Григорян Вагаршак Арамаисович

Д.м.н., профессор кафедры урологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Атауллаханов Равшан Иноятович,

Д.м.н., заведующий отделом государственного предприятия «Институт иммунологии Федерального управления медико-биологических и экстремальных проблем при Министерстве здравоохранения Российской Федерации», заведующий лабораторией активации иммунитета Института Иммунологии

Шпот Евгений Валерьевич,

К.м.н., доцент кафедры урологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Соблиров Тимур Барасбиевич

Кафедра урологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова
«ГНЦ институт иммунологии» ФМБА России
tb03@bk.ru

Аннотация: Приведены результаты сравнительного анализа пациентов с раком мочевого пузыря в до- и послеоперационном периоде. Установлено, что снижение степени дифференцировки рака мочевого пузыря с высокой до умеренной приводит к увеличению количества активированных HLA-DR+CD8+ Т клеток, при одновременном трехкратном снижении содержания перфорины в этих клетках. Данные изменения указывают на наличие длительной иммунной реакции, отражающей ранний рецидив или нерадикальность оперативного вмешательства.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, иммунный статус, HLA-DR+CD8+Т-клетки, послеоперационный период, рецидив, перфорин

Введение

Генетический аппарат клеток обладает сложной системой контроля деления, роста и дифференцировки клеток. Изучены две регулирующие системы оказывающие кардинальное влияние на процесс клеточной пролиферации: проонкогены и гены-супрессоры.

Система протоонкогенов и генов-супрессоров формирует сложный механизм контроля темпов клеточного деления, роста и дифференцировки. L.

В 80-х годах XX века в работах R.J. Ablin доказана роль иммунной системы в патогенезе рака мочевого пузыря [17].

Иммунный ответ организма на злокачественный рост представляет сложный комплекс процессов клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Динамика опухолевого роста в значительной мере определяется равновесием между факторами иммунного надзора с одной стороны и пробластогенными факторами, способствующими опухолевому росту, с другой [5,21].

Выявлено несколько принципиальных механизмов, препятствующих формированию адекватного иммунного ответа на опухоль: иммунологическая толерантность, отсутствие протективных антигенов, опухоль-индуцированная периферическая селекция Т-лимфоцитов и нарушение функции иммунокомпетентных клеток в опухолевом очаге, а также изменение спектра цитокинов TIL [3,7].

Иммунный ответ при развитии опухоли нарушается как на этапе презентации антигена, так и на этапе реализации эффекторной функции. Первыми клетками, которые подвергаются атаке со стороны опухоли являются дендритные, основные функции которых: поглощение, процессинг и презентация антигенов эффекторным клеткам в составе молекул главного комплекса гистосовместимости (система MCH/HLA) в комбинации с костимулирующими молекулами [19,27].

Молекулы антигенов гистосовместимости II класса не экспрессируются большинством нормальных эпителиальных клеток и появляются только при определенных патологических состояниях, включая воспаление, аутоиммунную патологию и злокачественную трансформацию [25]. Снижение уровня экспрессии антигенов II класса одна из серьезных причин отсутствия противоопухолевой активности Т-хелперов (CD4+Т-лимфоцитов). Экспрессия HLA-антигенов II класса обязательна не только для осуществления процесса распознавания опухолевого антигена CD4+Т-лимфоцитами, но и для приобретения опухолевыми клетками таких свойств как туморогенность и иммуногенность [25]. Считается, что HLA-гены II класса классически наследуются в сцеплении с генами, непосредственно участвующими в патогенезе заболеваний [9]. Носительство определенных HLA-антигенов II класса связано с риском развития некоторых заболеваний у их носителей [1,4].

На поверхности опухолевых клеток также нарушен синтез селектинов (напр.: CD44, ELAM-1) и интегринов (напр. GP3a), что коррелирует с плохим прогнозом заболевания [3,11]. Показано, что носительство аллельного гена PLA2, кодирующего b3 субъединицу интегрин GP3a, коррелируется с плохим прогнозом РПЖ в отношении инвазивного роста и метастазирования [13].

Одним из основных факторов, подавляющих функции лимфоцитов, находящихся в микроокружении опухоли, являются ганглиозиды (GD1a, GD2, GD3, GM1, GM2), экспрессирующиеся на поверхности опухолевых клеток и сливающиеся в межклеточное пространство. Эти ганглиозиды обладают способностью подавлять функции TIL, вмешиваясь в процессы трансдукции сигнала внутрь клетки. В ткани РПЖ увеличивается экспрессия GD1a и снижается экспрессия GD3. Увеличение титра IgA

к GD1a может являться «сигналом опасности» развития РПЖ [26].

На ранних стадиях заболевания основную роль в противоопухолевой защите играют цитотоксические CD8+Т-лимфоциты. Такая ситуация сохраняется лишь до тех пор, пока на поверхности опухолевой клетки в достаточном количестве экспрессируются молекулы главного комплекса гистосовместимости первого класса. По мере прогрессирования процесса снижается интенсивность экспрессии этих молекул вплоть до их полной потери и тогда основную роль в защите начинают играть NK-клетки, которые осуществляют антигеннезависимый лизис опухолевых клеток. NK-клетки обеспечивают естественную противоопухолевую защиту, ликвидируя клетки любых опухолей, независимо от наличия специфических антигенов на их поверхности, хотя эффективность их воздействия на клетки различных новообразований может существенно отличаться [6].

Натуральные киллеры представляют собой большие гранулярные лимфоциты, имеющие на поверхности ряд антигенных маркеров, характерных для макрофагов, Т-лимфоцитов, а также «собственных» антигенов-свидетелей, однако последние не являются строгоспецифичными для NK-клеток [10]. Интереснейшая проблема NK-надзора — это механизм цитотоксического эффекта. Здесь наряду с активирующим влиянием на ферменты деградации макромолекул рассматривается и возможность использования механизма «кислородного взрыва», характерного для проявления макрофагальной цитотоксичности [18,20,23].

Несмотря на наличие эффективных механизмов функционирования NK-клеток в большинстве случаев иммунная система организма не способна самостоятельно справиться с опухолью. Это связано, по-видимому, с тем, что на ранних этапах развития опухолевая ткань не распознается как чужеродная, а на более поздних — суммарное количество опухолевых клеток значительно превышает количество натуральных киллеров [15,16].

Под действием клеток опухоли функция TIL настолько изменяется, что вместо протективной функции они начинают способствовать опухолевой прогрессии. Известно, что TIL, выделенные из опухоли, имеют другое соотношение синтезируемых цитокинов, чем TIL, культивированные *in vitro* [2,8]. В частности, наблюдается повышенная экспрессия IL-6, являющегося фактором роста для некоторых опухолей, TGF-b, IL-10 [24]. В ряде случаев эти клетки начинают секретировать факторы роста сосудов (VEGF, EGF) и IL-8, обладающие ангиогенными свойствами и способствующие опухолевой прогрессии [3].

В последнее время активно обсуждается концепция, согласно которой в процессе возникновения и развития опухоли происходит, прежде всего, нарушение баланса между секрецией проопухолевых (IL-6, кислотолабильная фракция ИФН- α , ИФН- β), противоопухолевых (IL-2, кислотостабильная фракция ИФН- α , ИФН- β , TNF- α), а также регуляторных (ИФН- γ) цитокинов [14].

Интерферонам принадлежит ключевая роль в активации естественной цитотоксичности. Все типы ИФН стимулируют натуральные киллеры, составляющие основу естественной цитотоксичности. Преинкубация натуральных киллеров с интерфероном повышает их способность «прилипнуть» к клеткам-мишеням, увеличивает количество рецепторов, повышающих адгезивные свойства киллеров по отношению к раковым клеткам [12,22].

Материал и методы

В исследование включено 60 больных РМП. Из них, мужчин — 39 (65%), женщин — 21 (35%). У всех больных диагноз РМП верифицирован гистологически при биопсии опухоли после цистоскопического исследования или после выполненного оперативного вмешательства (ТУР). В исследуемую группу включено 27 (45%) пациента с поверхностным раком мочевого пузыря, перенесших ТУР, немедленную однократную инстилляцию митомицина С и последующую системную и внутривезикулярную иммунотерапию. Контрольную группу составили 25 (41,7%) больных, которым выполнена стандартная ТУР, немедленная однократная инстилляцией митомицина С. 8 больным (13,3%) с инвазивным раком МП, которым выполнена биопсия стенки мочевого пузыря, произведена оценка иммунного статуса. В этой группе иммунотерапия не проводилась.

Возраст больных составил 26–80 лет, средний возраст — $60,5 \pm 8,5$ лет, медиана — 61 год, интерквартильный размах — 54,5–67 лет.

Для стадирования опухолевого процесса использовали классификацию ВОЗ по системе TNM от 2009 года. Для оценки вероятности возникновения рецидива или прогрессирования опухоли, с целью определения у каждого больного группы риска — таблицы, а также электронный калькулятор, разработанные Европейской организации по изучению и лечению рака в 2004–2006 гг.

У 52 больных, включенных в исследование, определялась I стадия опухолевого процесса; у 8 — имел место инвазивный рак мочевого пузыря. Степень инвазии оценивалась при УЗ-исследовании абдоминальным датчиком, а также магнитно-резонансной и мультиспиральной компьютерной томографии. Всем больным, включенным в исследование, выполнен ТУР мочевого пузыря. Из об-

щего числа больных, с папиллярной опухолью, не прорастающей в собственную пластинку (Ta) — 11 (21,1%), с инвазией в субэпителиальную основу (T1) — 41 (78,9%) пациентов.

У всех больных при морфологическом исследовании выявлен переходно-клеточный РМП. В зависимости от дифференцировки опухоли больные распределились следующим образом: высокодифференцированная (G1) отмечена у 38 (63,3%) больных, умеренно дифференцированная (G2) — у 18 (30%), низкодифференцированная (G3) — у 4 (6,7%), (рисунок 2.6).

Немаловажным аспектом в определении группы риска больного является количество опухолевых очагов в полости мочевого пузыря. Одиночная опухоль выявлена у 38 (63,3%) больных, от 2 до 5 опухолевых очагов — у 18 (30%) и у 4 (6,7%) пациентов — 5 и более. Среднее количество опухолей составило — $2,3 \pm 2,4$ (1–8), медиана — 1, интерквартильный размах — 1–3.

У всех больных на дооперационном этапе определяли размер опухоли посредством УЗИ, ТРУЗИ, МРТ, цистоскопии. Полученные данные распределялись на 2 значения: опухоли до 3 см и опухоли больше или равные 3 см. В первом и во втором случаях было — 45 (75%) и 15 (25%) больных соответственно.

Таким образом, у большинства из 52 больных, включенных в исследование, определялись первичные, одиночные опухоли с низкой степенью злокачественности, с прорастанием в субэпителиальный слой, размером до 3 см. Дополнительно стоит отметить, что ни у одного из исследуемых больных наличия рака *in situ* не выявлено. Согласно номограммам EORTC представленная характеристика опухолей у всех больных, включенных в исследование, соответствуют промежуточной группе риска.

Исследование иммунного статуса у больных раком мочевого пузыря проводилось до и через 2 недели после проведенного оперативного лечения.

Результаты

Сравнительный анализ показал достоверное снижение количества активированных HLA-DR⁺CD8⁺ Т клеток в послеоперационном периоде у 67% больных (Рисунок 1). Также отмечено умеренное повышение количества лимфоцитов у 34% больных (Рисунок 2).

У 79% пациентов было повышено количество активированных CD8+CD25+Т клеток с экспрессированной на поверхности CD8+Т-клеток молекул CD25 (α -цепь рецептора интерлейкина-2).

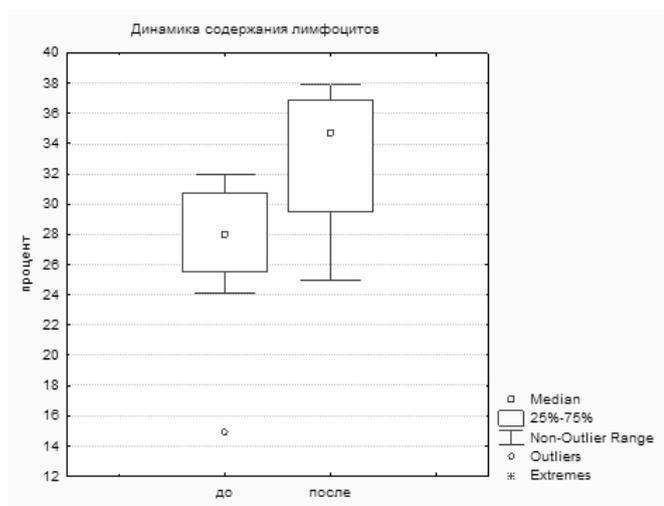


Рисунок 1.
Изменение количества лимфоцитов у больных раком мочевого пузыря до и после оперативного лечения

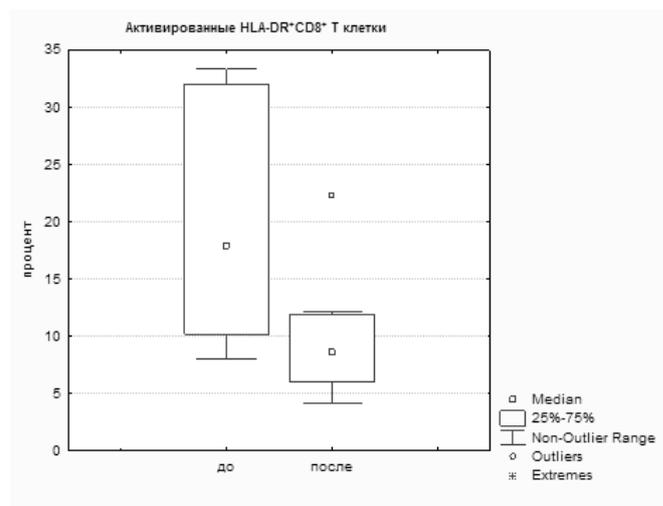


Рисунок 2. Изменение количества активированных HLA-DR+CD8+ Т клеток у больных раком мочевого пузыря до и после оперативного лечения

У больных раком мочевого пузыря выявлены иммунологические отличия в зависимости от злокачественности опухолевого процесса. Количество активированных HLA-DR+CD8+ Т клеток достоверно было выше у пациентов с инвазивным раком мочевого пузыря.

У пациентов с рецидивом рака отмечалось замедление дифференцировки CD8+Т-клеток: на фоне повышения количества «наивных» CD8+45RA+Т-клеток (61,28% больных) количество CD8+CD45RA-RO+ Т-клеток, «стареющих» после реакции на антиген, было снижено у 28% больных.

Обсуждение

Проведенных иммунологические тесты у больных раком мочевого пузыря доказали наличие ряда иммунных нарушений. В частности, выявлено диспропорция между изотипами в популяции NK-клеток. Количество CD16+56-NK (NK-клеток с низкой цитолитической активностью) оказалось значительно выше верхней границы нормы у 74% больных ($K_m = 2,8$), в то время как число CD16+56+NK (т.е. NK-клеток с умеренной цитолитической активностью, которые составляют большую часть естественных киллеров) было снижено у 47% больных.

При анализе популяционного состава лимфоцитов у больных раком мочевого пузыря статистически значимых количественных изменений выявлено не было, однако отмечались функциональные отклонения. Число активированных HLA-DR+CD4+Т-клеток в периферической крови было повышено у 68% больных. Это происходило за счет уменьшения количество «наивных» CD4+CD45RA+/RO- Т клеток и перехода их в зрелые

клетки «памяти» CD4+CD45RA-/RO+. У 89% больных значительно нарастало содержание CD4+28- Т клеток, потерявших рецепторы CD28 после антигенной активации. У обследованных нами больных раком мочевого пузыря было обнаружено значительное увеличение популяции регуляторных CD4+25+Т-клеток, что указывает на наличие у них длительного иммунного процесса.

Общее количество CD8+ Т-клеток в периферической крови больных раком мочевого пузыря оставалось в пределах нормы. Вместе с тем, отмечались различные изменения, свидетельствующие о вовлечении данной популяции в патологический процесс. Отличительной особенностью CD8+ Т клеток у больных данной группы было массовый переход в зрелые формы -CD8+28- Т клетки, потерявшие рецепторы CD28 после активации.

Сравнительный анализ иммунного статуса пациентов показал, что снижение степени дифференцировки рака мочевого пузыря с высокой до умеренной приводит к увеличению количества активированных HLA-DR+CD8+ Т клеток, при одновременном трехкратном снижении содержания перфорина в этих клетках. Это свидетельствует о возникновении недостаточности цитолитических свойств CD8-клеток по мере прогрессирования опухолевого процесса и снижении степени дифференцировки.

Заключение

Данные изменения указывают на наличие длительной иммунной реакции, отражающей, по всей видимости, ранний рецидив или нерадикальность оперативного вмешательства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Л. П. Система Ia-антигенов. Генетика, структура, функция //Иммунология.-1988.-№ 6.-С.29–31.
2. Бережная Н.М., Чехун В. Ф. Иммунология злокачественного роста. — Киев: Наукова Думка, 2005. — 792с
3. Головизин М. В. Вмешательство раковых клеток в процессы созревания и селекции Т-лимфоцитов как фактор опухолевой прогрессии //Иммунология. — 2001. — № 6. — С. 4–10.
4. Зарецкая Ю. М. Иммунология тканевой несовместимости. — М.: Медицина, 1983. — 208с.
5. Климович В. Б. Моноклональные антитела на основе репертуара иммунного ответа мышей линии SJL/J //Медицинская иммунология.-1999.-Т.№ 1–2 (1).
6. Кузнецов В.П. и др. Концепция иммунокоррекции при многофакторных иммунодефицитных состояниях, инфекционных и онкологических заболеваниях //Микробиология. — 1996. — № 5. — С. 104–110.
7. Молчанов О. Е., Попова И. А., Козлов В. К., 2001. Современные прогностические системы в оценке эффективности системной химиоиммунотерапии. — // *Медицинская иммунология.-2001.-Т.3.-№ 2.-С.301.*
8. Молчанов О.Е., Попова И. А., Козлов В. К. Современные прогностические системы в оценке эффективности системной химиоиммунотерапии //Медицинская иммунология.-2001.-Т.3.-№ 2.-С.301
9. Наумов Ю. Н. Структура генов и антигенов HLA человека 12 классов //Иммунология. — 1994.-№ 2(48).-С.45–48.
10. Павлович С. А. 1997. *Основы иммунологии.* 1997.
11. Пальцев М. А., Иванов А. А. Межклеточные взаимодействия.-М.: Медицина, 1985
12. Ройт А., Бростофф Д., Мэйл Д. Иммунология.-М.: Издательство: Мир ISBN: 5–03–003305-Х. — 2000.-593с.
13. Серегин А. А., 2005. Клиническое значение аллельного распределения гена интегрина GP3A при раке предстательной железы: автореф. дис. . . . канд. мед наук. — М., 2005.-26с.
14. Цыган В. Н. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза: учебное пособие /Под ред. Ю. Л. Шевченко. — М.: Гэотар-мед, 2004.
15. Эпштейн О.И., Шерстобоев Е. Ю., Мартюшев-Поклад А. В. Иммунология и аалергология.-М., 2004.
16. Яриллин А. А. Основы иммунологии.-М.: Медицина. — 2000.-608с.
17. Ablin R. J. Prostate antigen(s) //J Natl Cancer Inst.-1981. — Nov.67(5):992.
18. Brutkiewicz R.R., Sriram V. Natural killer T(NKT) cells and their role in antitumor immunity //Crit Rev Oncol Hematol.-2002. — Mar. 41(3):287–98.
19. Davies HT. Exploring the pathology of quality failings: measuring quality is not the problem — changing it is. //J Eval Clin Pract.-2001. — May;7(2):243–51.
20. Hameg A., Apostolou I. [et al]. A subset of NKT cells that lacks the NK1.1 marker, expresses CD1d molecules, and autoperforms the alpha-galactosylceramide antigen //J Immunol.-2000.-Nov.1;165(9):4917–26
21. Hellstrom J.G., Chambers D. C., Bradley W.R AIDS: recent events //Med Sect Proc.-1985.-P.69–77.
22. Hersey P, Schibeci S. D. [et al]. Potentiation of lymphocyte responses by monoclonal antibodies to the ganglioside GD3. //Cancer Res.-1986.- Dec;46:12 Pt1.
23. Hong C., Park S. H. Application of natural killer T cells in antitumor immunotherapy //Crit Rev Immunol.-2007. — 27(6):511–25
24. Kim O., Jiand T., Xie Y. et. al. Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells // Oncogene.-2004. — Mar 11;23(10):1838–44
25. Loeb S, Folkvaljon Y. [et al]. Evaluation of the 2015 Gleason Grade Groups in a Nationwide Population-based Cohort. //Eur Urol.-2015.-Dec17.pii: S0302–2838(15)01207–5.
26. Ravindranath M.H., Jucaud V., Maehara C. Y., Terasaki P.I Significance of the differences in the prevalence of anti-HLA antibodies in matched pairs of mother's and cord blood //Immunol Lett./-2015/- Dec 22;170:68–79.
27. Sumar N., Isenberg D. A. [et al]. Reduction in IgG galactose in juvenile and adult onset rheumatoid arthritis measured by a lectin binding method and its relation to rheumatoid factor //Ann Rheum Dis.-1991-Sep;50(9):607–10.

© Аляев Юрий Геннадьевич, Григорян Вагаршак Арамаисович,

Атауллаханов Равшан Иноятович, Шпоть Евгений Валерьевич, Соблиров Тимур Барасбиевич (tb03@bk.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»

