

THE PECULIARITIES OF THE CELLULAR STATUS OF IMMUNITY IN PATIENTS WITH UTERINE CERVICAL CANCER

Tillyashaykhov M.N.¹, Kamishov S.V.² (Republic of Uzbekistan)

Email: Tillyashaykhov437@scientifictext.ru

¹Tillyashaykhov Mirzagaleb Nigmatovich – Professor, Doctor of Medical Science, Director;

²Kamishov Sergey Viktorovich – MD, PhD, Senior Researcher,

CHEMOTHERAPY DEPARTMENT,

REPUBLICAN SPECIALIZED SCIENTIFIC AND PRACTICAL MEDICAL CENTER OF ONCOLOGY AND RADIOLOGY OF THE MINISTRY OF HEALTH OF THE REPUBLIC OF UZBEKISTAN, TASHKENT, REPUBLIC OF UZBEKISTAN

Abstract: the aim of the study was to study the basic cellular parameters of adaptive immunity in patients with cervical cancer. The decreased immunoreactivity of the T - cell link can be considered as a result of a violation of the antigen presentation to immune system cells, as well as a violation of the function of the T cells themselves. Thus, the detected lymphopenia is often characteristic of the background or after chemotherapy and radiation therapy. Suppression of IRI indicates the presence of T-cell immunodeficiency, as mentioned above, mainly due to a decrease in the number of T-helpers / inducers, which play an important role in the implementation of the immune response. Increase in T-cytotoxic lymphocytes, which indicates the suppression of T-cell immunity and the presence of cytotoxic action at the cellular level. More typical for terminal stages of cancer. The increase in CD38 + and CD95 +, confirms the presence of T-cell immunodeficiency due to death or apoptosis of T-lymphocytes. The increase of these markers always indicates immunodeficiency and activation of lymphocytes, which indicates an active pathological process.

Keywords: cervical cancer, cellular immunity unit, immune response, antitumor immunity.

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО СТАТУСА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

Тилляшайхов М.Н.¹, Камышов С.В.² (Республика Узбекистан)

¹Тилляшайхов Мирзагалёб Нигматович – профессор, доктор медицинских наук, директор;

²Камышов Сергей Викторович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела, отдел химиотерапии,

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр онкологии и радиологии
Министерства здравоохранения Республики Узбекистан,
г. Ташкент, Республика Узбекистан

Аннотация: целью исследования явилось изучение основных клеточных параметров адаптивного иммунитета у больных РШМ. Выявлена пониженная иммунореактивность Т - клеточного звена может рассматриваться как результат нарушения представления антигена клеткам иммунной системы, а также нарушение функции самих Т-клеток. Таким образом, выявленная лимфопения часто характерна на фоне или после химиотерапии и лучевой терапии. Подавление ИРИ свидетельствует о наличии Т-клеточного иммунодефицита, как было сказано выше, в основном за счет снижения количества Т-хелперов/индукторов, которые играют важную роль в реализации иммунного ответа. Повышение Т-цитотоксических лимфоцитов, что свидетельствует о подавлении Т-клеточного иммунитета и о наличии цитотоксического действия на клеточном уровне. Более характерно для терминальных стадий рака. Повышение CD38+ и CD95+, подтверждает наличие Т-клеточного иммунодефицита за счет гибели или апоптоза Т-лимфоцитов. Повышение этих маркеров всегда свидетельствует об иммунодефиците и активации лимфоцитов, что указывает на активный патологический процесс.

Ключевые слова: рак шейки матки, клеточное звено иммунитета, иммунный ответ, противоопухолевой иммунитет.

Введение. Согласно данным, опубликованным в Eucare-3 Study, пятилетняя выживаемость больных раком шейки матки (РШМ) не превышает 29 — 30% [1,4,5,8]. По данным различных авторов, эта цифра, несмотря на успехи хирургии и химиотерапии, остановилась на уровне 42% [2,4]. Основными причинами неэффективности усилий по улучшению отдаленных результатов лечения больных РШМ являются отсутствие не только четких представлений об этиологии и патогенезе, патогномичных симптомах различных стадий заболевания, а также низкая эффективность лечения при III — IV стадиях и отсутствие специфических иммунотропных методов лечения [4,6,8]. Не зря этот вопрос волнует многих специалистов, как ученых, так и онкологов, в связи с расширением возможностей исследования в области биологии опухолевого роста, особенно при РШМ, можно выявить факторы, имеющие практическое значение для понимания иммунопатогенетических механизмов развития,

метастазирования, рецидивирования опухоли, а также явиться теоретическим обоснованием для введения новых подходов к лечению данного заболевания. В последнее время накопилось много фактов, свидетельствующих об иммуногенности различных опухолей, в том числе и РШМ. Результаты таких исследований позволяют предположить, что оценка иммунного профиля опухоли может иметь значение в условиях персонализированной медицины. Терапевтические подходы противоопухолевой иммунотерапии основаны на стимуляции противоопухолевого иммунитета в результате воздействия на неспецифическое или адаптивное эффекторное звено иммунной системы. Считается, что иммунная система распознает опухолевый процесс, формирует специфические антитела и целый пул специфических цитотоксических иммунокомпетентных клеток, что является важным условием активации и реализации противоопухолевого иммунитета [1,5]. Однако, до сих пор в литературе отсутствуют или недостаточно описаны данные об эффективности применения иммунотерапии в комбинации лечения больных РШМ. В связи со сказанным выше, иммунотерапия РШМ является относительно новым направлением, используемым в медицине, и при этом, оставляющим большие надежды [6]. Сегодня в литературе, недостаточно раскрыты механизмы иммунных изменений, которые влияют на эффективность терапии и прогнозирование течения заболевания. Необходимо отметить, что большие достижения в области молекулярно-генетических исследований стимулировали широкое изучение возможностей иммунотерапевтических методов для лечения онкологических больных. Как показано в литературе, применение иммунотерапии направлено на индукцию как врожденного, так и адаптивного иммунитета организма для реализации противоопухолевой активности.

Цель исследования. Изучить особенности иммунных нарушений (основных показателей клеточного иммунитета) в группе больных раком шейки матки.

Материалы и методы исследования. В обследование были включены больные РШМ T₂₋₃N₀₋₁M₀ стадий (II-III клинические стадии), проходивших обследование и лечение в отделениях онкогинекологии и химиотерапии РСНПМЦОиР МЗРУз с 2010 по 2015 гг. В соответствии с поставленными задачами исследования, были рандомизированы следующие группы больных РШМ: 1 группа – 34 практически-здоровых лиц; 2 группа - 42 больных РШМ до начала лечения. На первом этапе клинического обследования у всех больных РШМ проводили сбор анамнеза заболевания, анамнестических данных, общий осмотр, обследование молочных желез, осмотр наружных половых органов, влагалища и шейки матки в зеркалах, а также проводили бимануальное ректовагинальное исследование. Всем больным проводили клинико-лабораторные исследования крови, куда входило изучение общего анализа крови и мочи, биохимических и иммунологических показателей, а также свертывающей системы крови. Больным проводилось комплексное клинико-инструментальное обследование, направленное на уточнение распространенности опухолевого процесса и выявление имеющихся осложнений, включающее осмотр шейки матки и влагалища в зеркалах, цитологические, морфологические исследования биопсийного материала, ультразвуковое исследование органов брюшной полости и малого таза, рентгенографию грудной клетки и компьютерную томографию. Иммунологическое обследование проведена до начала терапии после установления диагноза.

Иммунологические исследования включали изучение клеточных у больных РШМ. Определение клеточного иммунитета (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+, CD20+), а также идентификация активационных маркеров лимфоцитов (CD25+, CD38+ и CD95+) проводилась методом проточной цитофлуориметрии на AccuriC6 (USA) с использованием МКАт. При проведении статистического анализа данных, представленных в работе, полученные результаты исследования вносились в базы данных, подготовленные в программе MicrosoftExcel XP. Численные (непрерывные) величины были представлены в виде средних арифметических значений и ошибки среднего (M±m). Сравнение количественных признаков проводилось с помощью критерия Стьюдента, для непрерывных переменных – парного критерия Стьюдента. В качестве граничного сравнительного критерия статистической значимости достоверности принимали p<0,05. На диаграммах, представленных ниже за контроль т.е. нормативные значения взяты за 100%.

Полученные результаты исследований и их обсуждение. В последние годы большое внимание уделяется особенно клеточным и гуморальным иммунологическим факторам, которые являются своеобразными показателями характера течения заболевания, особенно при онкологических заболеваниях [2,5,7]. К основным факторам иммунитета, которые были изучены и будут представлены ниже, относятся клеточные факторы и гуморальные параметры: иммуноглобулины, циркулирующие иммунные комплексы. Следует отметить, что перечисленные параметры иммунитета являются неспецифическими факторами, но изучение их на фоне конкретной нозологии и сопоставление полученных результатов с клиническими проявлениями заболевания имеют определенно важное, специфическое значение, т.к. именно элементы иммунной системы сопровождают все процессы патогенеза, развития заболевания, его прогрессирования и исход. Установлено, что к фенотипическим маркерам лимфоцитов относятся такие маркеры, как CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD20+. В литературе широко показано, что запуск и регуляция эффективности иммунного ответа во многом

определяется специфическим антигеном Т-лимфоцитов. Ответственными за эту функцию являются антигенраспознающие рецепторы – TCR. Известно, что степень поверхностной экспрессии CD3+ рецепторов на мембране Т-лимфоцитов отражает его трансмиссивную функцию и позволяет идентифицировать общее количество Т-лимфоцитов [3,5]. Так, анализ иммунофенотипа CD3+ Т-лимфоцитов у больных РШМ показал наличие достоверного подавления экспрессии CD3+ на Т-лимфоцитах по сравнению с данными контрольной группы ($p < 0,05$). Следовательно, отмечено снижение экспрессии CD3+, что скорее всего является токсическим и депрессивным воздействием опухоли на факторы клеточного иммунитета. Очевидно, снижение общего пула Т-лимфоцитов (CD3+) отмечалось в основном за счет подавления экспрессии CD3+CD4+. Изучение экспрессии CD3+CD4+ на Т-лимфоцитах, которые являются основными регуляторными клетками иммунитета показало, что наименьшее значение отмечено в группах больных РШМ до начала лечения ($p < 0,05$). Показано в литературе, что CD4+Т-клеточный ответ на опухолевые белки является важным клеточным механизмом защиты макроорганизма, поскольку CD4+Т-хелперы стимулируют продукцию антител В-лимфоцитами и активируют CD8+Т-лимфоциты, специфичные для опухолевых клеток [2,7]. Анализ, показал, что в группе больных РШМ экспрессия CD3+CD4+ составила $21,4 \pm 1,8\%$, тогда как в группе практически здоровых лиц – $36,8 \pm 1,2\%$. Цитотоксические CD3+CD8+Т-лимфоциты играют важную роль в патогенезе онкологических заболеваний [2]. Доказано, что функцией этих клеток является распознавание антигенов на клеточной поверхности в комплексе с молекулами МНС I класса. Поскольку они присутствуют практически на всех ядерных клетках организма, любая клетка, несущая молекулы МНС I класса в комплексе с антигенным пептидом, может активировать клон цитотоксических Т-лимфоцитов. Биологической ролью данной активации является удаление мутантных клеток [1,3]. CD3+CD8+Т-лимфоциты играют главную роль в элиминации вируса, что обусловлено, с одной стороны, их способностью вызывать гибель инфицированных клеток, экспрессирующих соответствующие пептиды, презентированные молекулами МНС I класса, а с другой стороны – способность секретировать противоопухолевые факторы - цитокины [2]. Анализ экспрессии CD3+CD8+ на Т-лимфоцитах выявил достоверное повышение у больных РШМ по сравнению со значением группы практически здоровых лиц. Следует отметить, что максимальное повышение CD3+CD8+ выявлено в группе больных до лечения ($p < 0,05$). Существенное значение при вторичных иммунодефицитных состояниях имеет иммунорегуляторный индекс (ИРИ), который является соотношением значений CD3+CD4+/CD3+CD8+. Известно, что в норме ИРИ у здоровых составляет в среднем $1,52 \pm 0,02$. Очевидно, что подавление экспрессии CD3+CD4+ на фоне повышения экспрессии CD3+CD8+ приводит к снижению ИРИ. По нашим данными, наименьшее снижение ИРИ отмечается в группе больных до лечения при сравнении с данными контрольной группы. Видимо, снижение ИРИ является важным критерием глубины Т – клеточного иммунодефицитного состояния.

Далее, была изучена экспрессия киллерных клеток, которые являются третьей популяцией лимфоцитов, обеспечивающих поддержание генетического гомеостаза, которые фенотипически и функционально существенно отличаются от Т- и В-лимфоцитов [2]. Киллерные лимфоциты относятся к категории основных эффекторов естественного или врожденного иммунитета, которые способны лизировать клетки-мишени или осуществлять антителозависимую клеточную цитотоксичность. Именно им присуще выполнение функций первой линии защиты до того, как возникнут иммунные Т-лимфоциты и специфические антитела [5,6]. Нами изучены киллерные клетки с фенотипами CD16+. Выявлено достоверное повышение экспрессии CD16+ во всех группах больных РШМ ($p < 0,05$). Так, в группе больных до лечения экспрессия CD16+ составила $25,7 \pm 1,2\%$, в группе практически здоровых лиц – $16,8 \pm 1,2\%$. Изучение экспрессии CD20+ на В-лимфоцитах, которые являются основными регуляторными клетками иммунной системы и имеющих важное значение в развитии гуморального иммунитета показало, что экспрессия CD20+ была достоверно повышена ($p < 0,05$). Исследование содержания В-лимфоцитов является важным критерием, позволяющим оценить глубину иммунодефицита и определить последующие действия в плане диагностики и лечения. Далее изучены активационные маркеры лимфоцитов периферической крови. Известно, что активационные маркеры лимфоцитов начали изучаться относительно недавно, поэтому в литературе освещены малочисленные работы, посвященные функциональной активности активационных маркеров лимфоцитов, в частности при онкологических процессах [1,3]. Из имеющихся литературных данных видно, что важное научное и практическое значение имеет изучение активационных маркеров лимфоцитов, особенно при пролиферативных процессах, т.к. анализ активационных маркеров лимфоцитов позволяет изучить процессы активации, пролиферации, дифференцировки и апоптоза иммунокомпетентных клеток и характеризует связанные с этими процессами клеточные циклы [6]. Так, нами были изучены маркеры лимфоцитов, такие как CD23+, CD38+ и CD95+. Известно, что CD38+ - активационный маркер, представленный трансмембранным гликопротеином, который рассматривается как мультифункциональный белок [6]. CD38+ экспрессирован на незрелых Т- и В-лимфоцитах, активированных Т-лимфоцитах, плазмочитах [6]. Анализ экспрессии CD38+ на лимфоцитах позволил выявить достоверное повышение данного

маркера в группе больных РШМ по сравнению с данными контроля ($p < 0,05$). Следовательно, повышенная экспрессия CD38+ наблюдалась до начала лечения больных, что видимо связано с пролиферативной активностью специфических Т- и В-лимфоцитов в ответ на злокачественный процесс. Согласно литературным данным, существуют сведения о роли APO-1/Fas (CD95+) рецепторов в процессе апоптоза, а его степень является отражением уровня апоптоза лимфоцитов [3,6]. Установлено, что рост экспрессии CD95+ рецепторов на лимфоцитах указывает на избыточный и неэффективный процесс стимуляции лимфоцитов крови, что свидетельствует об апоптотическом пути гибели лимфоцитов [6,7]. Связывание CD95+ с Fas – лигандом индуцирует апоптоз клеток, экспрессирующих CD95+. Анализ показал, что в группах больных РШМ отмечается повышенная экспрессия CD95+. Усиление экспрессии маркера апоптоза лимфоцитов является характерным признаком злокачественных процессов, чем и объясняется истощение пула лимфоцитов и формирования иммунодефицитного состояния. Известно, что CD23+ является специфическим рецептором иммуноглобулина Е. Известно, что под влиянием ИЛ-4 CD23+ начинает продуцироваться В-клетками и моноцитами в растворимой форме [1,2]. Анализ экспрессии CD23+ показал, что достоверное повышение экспрессии CD23+ на лимфоцитах больных РШМ. Следовательно, анализ активационных маркеров лимфоцитов показывает возможность практического применения активационных маркеров лимфоцитов в интерпретации состояния иммунной системы при онкологическом процессе. Таким образом, анализ полученных результатов позволил выявить выраженные изменения в клеточном звене иммунитета, которые проявляются подавлением экспрессии CD3+, CD3+CD4+, ИРИ, повышением экспрессии CD3+CD8+, CD16+ и CD20+клеток, а также повышенную экспрессию CD38+, CD23+ и CD95+. Очевидно, при данной патологии Т – клеточный иммунный ответ существенно слаб и направлен против меньшего числа эпитопов, что позволяет предполагать клональное истощение Т-лимфоцитов. В свою очередь, пониженная иммунореактивность Т - клеточного звена может рассматриваться как результат нарушения представления антигена клеткам иммунной системы, а также нарушение функции самих Т-клеток [3]. Таким образом, выявленная лимфопения часто характерна на фоне или после химиотерапии и лучевой терапии. Подавление ИРИ свидетельствует о наличии Т-клеточного иммунодефицита, как было сказано выше, в основном за счет снижения количества Т-хелперов/индукторов, которые играют важную роль в реализации иммунного ответа. Повышение Т-цитотоксических лимфоцитов, что свидетельствует о подавлении Т-клеточного иммунитета и о наличии цитотоксического действия на клеточном уровне. Более характерно для терминальных стадий рака. Повышение CD38+ и CD95+, подтверждает наличие Т-клеточного иммунодефицита за счет гибели или апоптоза Т-лимфоцитов. Повышение этих маркеров всегда свидетельствует об иммунодефиците и активации лимфоцитов, что указывает на активный патологический процесс.

Список литературы / References

1. *Antoni P.A.* CD4+CD25+ T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2// J. Immunother.- 2005. -Vol.28.-P.120-128.
2. *Chu C.S., Kim S.H., June C.H. et al.* Immunotherapy opportunities in ovarian cancer. Expert RevAnticancerTher 2008;8:243–57
3. *Gavalas N.G.* Immune response in ovarian cancer: how is the immune system involved in prognosis and therapy: potential for treatment utilization// Cancer Res. 2007. Vol. 67(1).-P.354-361.
4. *Gubser P.M. et al.* Rapid effector function of memory CD8+ T cells requires an immediate-early glycolytic switch. Nat. Immunol. 14, 1064–1072 (2013).
5. *Liu B., Nash J., Runowicz C. et al.* Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges. J HematolOncol 2010;3:7.
6. *Tomsová M.* Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma // Biomed. Biotechnol. - 2010.-2010:435745.
7. *Sato E., Olson S.H., Ahn J. et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. ProcNatlAcadSci USA 2005;102:18538–43.

Список литературы на английском языке / References in English

1. *Antoni, P.A.* CD4 + CD25 + Т регуляторные клетки, иммунотерапия рака и интерлейкин-2 // J. Immunother.- 2005. -Т.28.-С.120-128.
2. *Chu C.S., Kim S.H., June C.H. и другие.* Возможности иммунотерапии при раке яичников. Expert RevAnticancerTher 2008;8:243–57
3. *Gavalas N.G.* Иммунный ответ при раке яичников: как иммунная система вовлечена в прогноз и терапию: потенциал для лечения // Cancer Res. -2007.-Т.67.- С.354-361.

4. *Gubser, P. M. et al.* Быстрая эффекторная функция памяти CD8 + Т-клеток требует немедленного раннего гликолитического переключения. //Nat. Immunol. 14, 1064-1072 (2013).
5. *Liu B., Nash J., Runowicz C. и другие.* Иммуноterapia рака яичников: возможности, прогресс и проблемы.// J HematoOncol 2010, 3: 7.
6. *Tomsovä, M.* Прогностическое значение опухолепроникающих CD3 + лимфоцитов при карциноме яичников // Biomed. Biotechnol. 2010.-2010: 435745.
7. *Sato E., Olson S.H., Ahn J. et al.* Интраэпителиальные инфильтрационные опухолевые лимфоциты CD8 + и высокое соотношение CD8 + и регуляторных Т-клеток связаны с благоприятным прогнозом при раке яичников. ProcNatlAcadSci USA 2005, 102: 18538-43.