

УДК 632.938

А.В. Новицкая¹, А.В. Чуров¹, А.А. Романов²**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ
КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ**¹ Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ИБ КарНЦ РАН), г. Петрозаводск, Российская Федерация;² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Республиканский онкологический диспансер», г. Петрозаводск, Российская ФедерацияA.V. Novitskaia¹, A.V. Churov¹, A.A. Romanov²**PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS
OF REGULATORY T-CELLS (TREG) IN PATIENTS
WITH COLORECTAL CANCER**¹ Institute of Biology of Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS), Petrozavodsk, Russian Federation;² State Budgetary Institution of Healthcare «Republican Oncology Center», Petrozavodsk, Russian Federation

Резюме. *Целью работы* было изучение фенотипических и функциональных характеристик CD4⁺ Т-клеток и регуляторных Т-клеток (Treg) и их роли в формировании механизмов иммунной супрессии при колоректальном раке (КРР). **Материалы и методы.** Анализ экспрессии молекул опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (ОИЛ) и лимфоцитами крови осуществляли методом проточной цитометрии. Анализ мРНК CD39 проводили методом ПЦР в реальном времени. **Результаты.** Было показано, что у пациентов с КРР наблюдалось накопление периферических CD4⁺ Т-клеток с маркером CD39 на более поздних стадиях активности КРР. Среди ОИЛ число CD4⁺CD39⁺ Т-клеток было выше, чем в образцах крови, полученных у тех же больных. Вместе с тем, был установлен высокий уровень экспрессии CD39 у Treg-клеток как на периферии, так и среди ОИЛ пациентов с КРР. Были определены достоверные связи между содержанием CD4⁺CD39⁺ Т-клеток и показателями клеточного иммунитета у больных КРР. **Выводы.** Полученные данные демонстрируют рост активации Treg-клеток с фенотипом CD4⁺CD39⁺ Т-клеток при КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак; CD39; Treg-клетки; FOXP3; лимфоциты

Abstract. *The aim of the work* was to study the phenotypic and functional characteristics of CD4⁺ T cells, primarily regulatory T lymphocytes (Treg) and their role in the formation of immune suppression mechanisms in CRC, as well as in acute pancreatitis (AP). **Materials and methods.** Analysis of the expression of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and blood lymphocytes was performed by flow cytometry. Determination of the messenger RNA (mRNA) of the CD39 gene in the leukocyte fraction of peripheral blood was carried out in real time by the method of polymerase chain reaction (PCR). **Results.** An accumulation of peripheral CD39⁺CD4⁺ T cells in the later stages of CRC was observed. Among TILs, the presence of CD4⁺CD39⁺ T cells was higher than in blood samples obtained from the same patients. A high level of CD39 expression was determined in Treg cells obtained both in the periphery and among TILs of patients with CRC. Significant associations between the content of CD4⁺CD39⁺ T-cells and the indicators of cellular immunity in patients with colorectal cancer were determined. **Conclusions.** Thus, the data obtained demonstrate the activation of CD4⁺CD39⁺ T cells in CRC patients. **The funding:** financial support for research was carried out from a grant from the Russian Science Foundation (project No. 17-75-10182).

Keywords: colorectal cancer; CD39; Treg cells; FOXP3; lymphocytes; acute pancreatitis

Конфликт интересов отсутствует.
Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Чуров Алексей Викторович
achurov@yandex.ru

Дата поступления 15.04.2019.

Образец цитирования:

Новицкая А.В., Чуров А.В., Романов А.А. Фенотипические и функциональные характеристики регуляторных Т-клеток у больных колоректальным раком. Вестник уральской медицинской академической науки. 2019, Том 16, №2, с. 165–169, DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-2-165-169

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Aleksei V. Churov
achurov@yandex.ru

Received 15.04.2019.

For citation:

Novitskaia A.V., Churov A.V., Romanov A.A. Phenotypic and functional characteristics of regulatory T-cells (treg) in patients with colorectal cancer. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2019, Vol. 16, no. 2, pp. 165–169. DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-2-165-169 (In Russ)

Введение

Колоректальный рак (КРР) является одной из самых распространенных форм новообразований [1]. Развитие КРР тесно связано с механизмами регуляции иммунного ответа и сопровождается инфильтрацией опухоли иммунными клетками. Хроническое воспаление является фактором, способствующим развитию КРР [2].

Клетки Treg принимают активное участие в патогенезе опухолей и контроле развития воспаления [3–6]. Ведется активное изучение мембранного маркера Treg-клеток — эктонуклеотидазы-1 (ENTPD1, CD39), которая принимает участие в процессах генерации внеклеточного аденозина. В иммунных клетках аденозин осуществляет передачу сигнала через A2A рецептор (A2AR). Взаимодействие аденозина с A2AR лежит в основе механизмов, обеспечивающих защиту от воспаления. Активация этого пути происходит и в опухолевой ткани, что позволяет раковым клеткам ускользать от распознавания иммунной системой [7].

Целью работы было изучение фенотипических и функциональных характеристик CD4⁺ T-клеток, CD39⁺ Treg-клеток и их роли в формировании иммунной супрессии при КРР.

Материалы и методы

Обследовано 40 пациентов с диагнозом КРР (средний возраст 66±10,5 лет). Критерии исключения: наличие иных форм новообразований в анамнезе, а также иммуновоспалительных заболеваний. В качестве контроля использовали образцы 35 здоровых лиц (средний возраст 56,7±20,1 лет). Пациенты были выделены две группы: в первую — с I и II стадиями КРР, во вторую — с III и IV стадиями. Дополнительно оценивали активацию Treg-клеток в условиях воспалительного процесса при остром панкреатите (ОП) (n=25, в возрасте 46,7±15,2 лет). Критерии исключения — наличие в анамнезе других нозологий, прежде всего новообразований, а также аутоиммунных патологий. Все исследования у пациентов проводились до начала терапии.

Выделение ОИЛ осуществлялось методом ферментативной дезагрегации в среде, приготовленной на

основе RPMI-1640, с добавлением 10% FBS, 100 мкг/мл гентамицина и 1 мг/мл коллагеназы IV («Панэко», Россия). Лимфоциты крови выделяли на градиенте плотности фиколла (1,077 г/см³; «Панэко», Россия). Экспрессию молекул клетками оценивали методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 («Beckman Coulter», США) с добавлением антител CD4, CD8, CD25, CD127, CD3, CD16, CD19 («Beckman Coulter», США), FOXP3, CD39 (eBioscience, США). Статистическая обработка данных проводилась с использованием «GraphPad Prism V.7». Достоверность различий рассчитывали по критерию Манна-Уитни (p<0,05). Коэффициент ранговой корреляции Спирмена применялся для выявления и оценки характера связи между признаками. Полученные данные представлены в виде M±SD. Исследование выполнено на оборудовании «Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ЦКП КарНЦ РАН).

Результаты исследования

В работе проводилось определение содержания CD4⁺CD39⁺ T-клеток в периферической крови и молекул опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов у больных КРР. Количество CD4⁺ T-клеток с маркером CD39⁺ на периферии сильно варьирует. На поздних стадиях КРР уровень CD4⁺CD39⁺ лимфоцитов был выше, чем в контроле (12,06±3,5 при КРР против 6,9±2,7 в контроле; p<0,05).

В опухолевой ткани количественное содержание CD4⁺CD39⁺ клеток было в 4 раза выше, чем в периферической крови, полученной от тех же больных (17,54±9,1 при КРР, против 3,9±2,1 в контроле; p<0,05). Было отмечено высокое содержание CD4⁺CD39⁺ клеток среди ОИЛ. При этом в опухолевой ткани доля CD4⁺CD39⁺ клеток была выше, чем CD4⁺CD39⁺ (46,04±5,2 при КРР, против 18,1±9,4 в контроле; p<0,05).

Нами было проведено исследование популяционного состава периферических лимфоцитов (T-клетки и их субпопуляции, B-клетки и NK-клетки) у пациентов с КРР. Полученные в результате цитометрического анализа данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание основных популяций лимфоцитов в периферической крови здоровых доноров, больных КРР и больных ОП в % от общего числа лимфоцитов

Table 1

The content of the main lymphocyte populations in the peripheral blood of healthy donors, patients with CRC and patients with AP in% of the total number of lymphocytes

Фенотипы / Phenotypes	Контроль / Control (n=35)	Пациенты с КРР / Patients with CRC		Пациенты с ОП / Patients with AP (n=25)
		I-II стадии / I-II stages (n=20)	III-IV стадии / III-IV stages (n=20)	
CD3 ⁺ (Т-клетки)	70,01±5,1	65,86±5,7	64,32±5,4*	66,74±4,4*
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (Т-хелперы)	41,57±6,2	33,50±8,4*	36,26±5,4*	35,66±6,3*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ (активир. Т-хелперы)	10,34±5,4	6,77±3,1*	5,78±2,2*	7,40±2,6*
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (ЦТЛ)	22,05±4,9	32,25±5,6*	27,08±6,9**	28,54±6,2*
CD3 ⁺ CD19 ⁺ (В-клетки)	12,06±3,2	8,33±4,8*	6,09±2,7*	7,40±5,0
CD3 ⁺ CD16 ⁺ (NK-клетки)	13,94±5,2	12,39±4,2	15,26±7,5	19,98±6,0*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} (Трег-клетки)	4,48±1,4	5,78±1,4*	4,60±1,5	6,97±2,1*

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$, # — различия достоверны по сравнению с показателями пациентов с I–II стадиями КРР при $p < 0,05$.

Note: * — the differences are significant compared with the control at $p < 0.05$, # — the differences are significant compared with the results of patients with stages I–II of CRC at $p < 0.05$.

При КРР отмечено снижение содержания В-лимфоцитов, CD3⁺ Т-клеток и Т-хелперов, а также повышенное содержание CD8⁺ ЦТЛ ($p < 0,05$).

Нами была произведена оценка связи между изменениями в популяционном составе лимфоцитов и общим количеством CD4⁺CD39⁺ Т-клеток у пациентов с КРР. В результате была отмечена отрицательная корреляция между уровнями CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов и CD4⁺CD39⁺ Т-клеток ($r = -0,61$, $p < 0,05$), между CD3⁺CD19⁺ В-клетками и CD4⁺CD39⁺ Т-клетками ($r = -0,45$, $p < 0,05$), а также между значением иммунорегуляторного индекса (отношение клеток CD4⁺/CD8⁺) и CD4⁺CD39⁺ Т-клеток ($-0,62$, $p < 0,05$). Полученные данные указывают на непосредственное участие CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в иммуносупрессорных механизмах в процессе развития КРР.

Субпопуляция Трег-клеток играет важную роль в процессах канцерогенеза. Кроме того, способность

экспрессировать молекулу CD39 и принимать участие в генерации внеклеточного аденозина может рассматриваться в качестве основных механизмов иммуносупрессии. Исследование содержания Трег-клеток с фенотипом CD25⁺CD127^{lo/-} показало, что на I и II стадиях КРР количество CD25⁺CD127^{lo/-} Трег-клеток увеличено (по сравнению со здоровыми донорами), тогда как на поздних стадиях — не отличалось от контроля (табл. 1). Также было установлено усиление уровня экспрессии CD39 на Трег-клетках (CD25⁺CD127^{lo/-}, CD4⁺CD25^{hi}) в крови онкологических больных (табл. 2).

Таблица 2

Уровень экспрессии эктонуклеотидазы CD39 в популяции CD4⁺ Т-клеток у больных КРР в % от CD4⁺ Т-клеток

Table 2

The expression level of ectonucleotidase CD39 in the population of CD4⁺ T cells in patients with CRC in % of CD4⁺ T-cells

	CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-}
Контроль / Control (n=35)	5,71±3,5	42,21±5,6	41,95±2,4
Больные КРР I-II стадии / Sick CRC I-II stages (n=20)	6,27±4,3	54,01±4,5*	57,01±6,1*
Больные КРР III-IV стадии / Sick CRC III-IV stages (n=20)	6,97±3,7	67,72±4,9**	68,01±2,7**
ОИЛ (n=10)	34,09±14,1#	89,31±5,7#	Нет данных / No data

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем, ** — различия достоверны по сравнению с контролем и группой пациентов с I–II стадиями КРР, # — различия достоверны по сравнению с периферическими лимфоцитами тех же пациентов с КРР.

Note: * — the differences are significant compared to the control, ** — the differences are significant compared to the control and the group of patients with stages I–II of CRC, # — the differences are significant compared with peripheral lymphocytes of the same patients with CRC.

Кроме того, в рамках данной работы нами было проведено исследование экспрессии FOXP3 — транскрипционного фактора Трег-клеток — и его связи с экспрессией молекулы CD39. В результате была установлена прямая корреляция ($r = 0,51$ при $p < 0,05$) между экспрессией CD39 и FOXP3 на CD4⁺CD25^{hi} Т-клетках в крови больных КРР. Высокой экспрессией CD39 также отличались от периферических ОИЛ CD4⁺CD25^{hi} Трег-клетки, которые практически в полном составе экспрессировали данный маркер (табл. 2). Помимо этого, повышенная экспрессия CD39 также наблюдалась у нерегуляторных клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁻ (по сравнению с периферическими лимфоцитами), что

свидетельствует о стимуляции экспрессии CD39.

Дополнительно проводилось исследование изменения фенотипического и количественного состава лимфоцитов (в т.ч. Трег-клеток) у пациентов с острым панкреатитом (табл. 1). Общее содержание Т-лимфоцитов и CD4⁺ Т-клеток у данных больных было ниже, чем в контрольной группе. Также наблюдалось снижение количества активированных Т-хелперов (по сравнению с здоровыми донорами). Вместе с тем был установлен более высокий уровень экспрессии CD25 на Т-хелперах больных ОП, чем в контроле (24,37±7,4% и 17,29±7,1% от числа CD4⁺ Т-клеток соответственно, $p < 0,05$). При ОП отмечен высокий уровень содержания CD8⁺ ЦТЛ и НК-клеток (по сравнению со здоровыми донорами). Таким образом, признаки ослабления иммунитета проявляются не только у КРР больных, но и у пациентов с ОП. Кроме того, число периферических CD25⁺CD127^{lo/-} Трег-клеток у пациентов с острым панкреатитом выше, чем в контроле (табл. 1).

Результаты исследования экспрессии CD39 показали, что количество CD4⁺CD39⁺ Т-клеток у больных ОП составляет 9,31±2,5% от общего числа CD4⁺ Т-лимфоцитов, а в уровнях экспрессии CD39 Трег-клетками больных ОП наблюдалась схожая с КРР закономерность. Экспрессия молекулы CD39 выше на Трег клетках ($p < 0,05$) больных с ОП. Так, уровень экспрессии CD39 CD4⁺CD25^{hi} Трег-клетками составил 58,23±18,7%, тогда как на CD4⁺CD25^{lo/-} Трег-клетках — 61,54±15,4%. У CD4⁺CD25-лимфоцитов, не относящихся к Трег-клеткам, достоверные отличия от контроля не выявлены и уровень экспрессии CD39 составил 7,64±4,7%.

Как и при КРР нами была изучена степень вовлеченности популяции CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в механизмы иммунной супрессии больных ОП. Корреляционный анализ показал отсутствие достоверной связи (как при КРР) между содержанием CD4⁺CD39⁺ Т-клеток, уровнем экспрессии CD39 на CD25⁺CD127^{lo/-} Трег-клеток и количественных изменений в популяционном составе лимфоцитов больных ОП.

Обсуждение результатов

В работе изучали функциональную роль CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в процессах формирования иммунной супрессии у пациентов с КРР. При КРР на поздних стадиях канцерогенеза происходит накопление периферических CD4⁺CD39⁺, CD39⁺CD4⁺CD25^{hi} и CD39⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} клеток. При этом среди ОИЛ количество CD39⁺ Т-клеток значительно выше, чем в крови тех же пациентов. Мы предполагаем, что накопление Трег-клеток с высокой экспрессией маркера CD39⁺ среди ОИЛ происходит в результате рекрутинга лимфоцитов периферического пула. Результаты исследования свидетельствуют о том, что CD39⁺ Трег-клетки — это одна из доминирующих субпопуляций регуляторных Т-клеток при развитии КРР, в особенности на более поздних стадиях заболевания.

Изменения активации Трег-клеток наблюдаются и при развитии ОП, что выражается в увеличении содержания Трег-клеток с фенотипами CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}, CD39⁺CD4⁺CD25^{hi} и CD39⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} у больных. По-видимому, развитие состояния иммунной супрессии при ОП представляет собой компенсаторный механизм, который ограничивает степень развития воспалительной реакции и выполняет защитную роль.

Выводы

Таким образом, при КРР происходит значительное накопление количества CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих маркер CD39, являющийся медиатором иммунной супрессии. Кроме того, наиболее интенсивно идут процессы накопления CD39⁺-клеток среди инфильтрирующих опухоль лимфоцитов. Трег-лимфоциты составляют значительную долю клеток, экспрессирующих маркер CD39.

В настоящее время для разработки новых подходов в противоопухолевой терапии огромный интерес представляют возможности блокировки экспрессии эктонуклеотидазы CD39 и/или ограничение функционирования Трег-клеток. В связи с этим, требуется проведение дальнейших исследований, направленных на детальное изучение механизмов аденозин-A2AR-опосредованной иммунной супрессии у онкологических больных.

Финансирование: финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-10182).

ЛИТЕРАТУРА

1. Mougiakakos D. Regulatory T cells in colorectal cancer: from biology to prognostic relevance // *Cancers*. 2011. Vol.3. P. 1708-1731.
2. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol*. 2016. Vol. 17. P. 230-40.
3. Кравченко П.Н., Жулай Г.А., Чуров А.В., и др. Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови больных ревматоидным артритом. *Вестник РАМН*. 2016. Т. 71. С. 148-153.
4. Чуров А.В. Регуляторные Т-клетки и старение организма. *Успехи геронтологии*. 2013; Т.26. С. 603-609.
5. Жулай Г.А., Чуров А.В., Олейник Е.К. и др. Активация CD4+CD39+ Т-клеток при колоректальном раке // *Вестник РГМУ*. 2019. Т.7. С. 47-53.
6. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Чуров А.В., и др. Роль Трег-клеток в аденозин-опосредованной иммунной супрессии при колоректальном раке // *Медицинская иммунология*. 2017. Т.19. С. 89-94.
7. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology // *Oncogene*. 2013. Vol.32. P. 1743–1751.

REFERENCES

1. Mougiakakos D. Regulatory T cells in colorectal cancer: from biology to prognostic relevance. *Cancers*. 2011. Vol.3. pp. 1708-1731.
2. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol*. 2016; 17(3): 230-40.
3. Kravchenko P.N., Zhulai G.A., Churov A.V., et al. Subpopulations of Regulatory T-lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2016. Vol. 71. pp. 148–153 (in Russ).
4. Churov A.V. Regulatory T cells and aging. *Advances in gerontology*. 2013. Vol. 26. pp. 603-609 (in Russ).
5. Zhulai, G.A., Churov, A.V., Oleinik, E.K. Activation of CD4+CD39+ T cells in colorectal cancer. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2018. Vol.7. pp. 47-53
6. Zhulai GA, Oleinik EK, Churov AV et al. Significance of treg cells for adenosine-mediated immune suppression in colorectal cancer. *Medical Immunology (Russia)*. 2017. Vol.19. pp. 89–94 (in Russ).
7. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G. et al. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*. 2013. Vol.32. P. 1743–1751.

Авторы

Новицкая Анастасия Васильевна
Институт биологии — обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреж-
дения науки Федерального исследовательского цен-
тра «Карельский научный центр Российской академии
наук» (ИБ КарНЦ РАН
Старший биолог группы иммунологии
Российская Федерация, 185014, Республика Карелия,
г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

Чуров Алексей Викторович
Институт биологии — обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреж-
дения науки Федерального исследовательского цен-
тра «Карельский научный центр Российской академии
наук» (ИБ КарНЦ РАН
Кандидат биологических наук, старший научный со-
трудник группы иммунологии
Российская Федерация, 185014, Республика Карелия,
г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11
achou@yandex.ru

Романов Александр Анатольевич
ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер»
Врач-хирург онколог
Российская Федерация, 185002, Республика Карелия,
г. Петрозаводск, Лососинское шоссе, 5

Authors

Anastasija V. Novitskaia
IB KarRC RAS
Senior biologist, Immunology group
Pushkinskaya str. 11 Petrozavodsk Republic of Karelia
Russian Federation 185014

Aleksei V. Churov
IB KarRC RAS
Cand. Sci. (Biology), Senior researcher, Immunology
group
Pushkinskaya str. 11 Petrozavodsk Republic of Karelia
Russian Federation 185014
achou@yandex.ru

Aleksander A. Romanov
Republic Oncology Dispensary
Oncology surgeon
Lososinskoye Highway 5 Petrozavodsk, Republic of Karelia,
Russian Federation, 185002