

На правах рукописи

ЖУЛАЙ ГАЛИНА АНАТОЛЬЕВНА

**Регуляторные Т-клетки и аденозин-опосредованный механизм
иммунной супрессии при развитии колоректального рака**

03.03.03 - иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Петрозаводск – 2020

Работа выполнена в группе иммунологии Института биологии – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Олейник Евгения Константиновна

Официальные оппоненты:

Кадагидзе Заира Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Боженко Владимир Константинович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск.

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ года в ____ часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д.208.017.01. в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, по адресу: 115522, Москва, Каширское шоссе, д.24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте <http://nrcii.ru/dissertatsionnyu-sovet>.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

Гудима Георгий Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одним из способов уклонения опухоли от иммунологического надзора является индукция опухолевыми клетками иммунной супрессии (Whiteside, 2016; Ribatti, 2017). Непосредственными участниками этого процесса являются регуляторные Т-клетки (Treg), которые в норме подавляют чрезмерный иммунный ответ в организме, поддерживая иммунологическую толерантность. Однако при канцерогенезе Treg-клетки представляют интерес как возможные мишени для иммунотерапии, с целью ограничения их функционирования, поскольку предполагается, что они способствуют развитию опухоли.

Колоректальный рак (КРР) является одной из ведущих локализаций среди злокачественных новообразований в общей структуре онкологической заболеваемости в России и в мире (Федоров и Поделякин, 2017). Установлено, что его развитие тесно связано с инфильтрацией опухоли иммунными клетками (Ling et al., 2018). При КРР, также как и при других злокачественных новообразованиях, отмечается увеличение содержания Treg-клеток как в крови, так и среди опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), однако их роль при развитии данного заболевания в настоящее время четко не определена, поскольку есть данные о том, что в отличие от большинства типов рака, при КРР повышенное содержание инфильтрирующих опухоль Treg-клеток связано с положительным прогнозом выживаемости для больных (Ling et al., 2018), что представляет собой так называемый «парадокс колоректального рака» (Ladoire et al., 2011).

В последнее время в биологии Treg-клеток значительное внимание уделяется способности этой популяции секретировать эктонуклеотидазу CD39, которая участвует совместно с экто-5'-нуклеотидазой CD73 в генерации внеклеточного аденозина. Показана важная роль аденозина в ограничении противоопухолевого иммунного ответа (Ohta et al., 2009). Уже активно исследуются различные ингибиторы и блокирующие моноклональные антитела (mAb) против эктонуклеотидаз CD39, CD73 (Bastid et al., 2013; Perrot et al., 2019) и некоторых аденозиновых рецепторов (Gessi et al., 2018) в качестве противоопухолевых

агентов для повышения эффективности иммунотерапии. Однако применение этого подхода при лечении КРР остается под вопросом ввиду неопределенной роли популяции Трег-клеток у больных КРР и их действии посредством аденозин-опосредованного механизма иммунной супрессии. В связи с этим изучение функционирования Трег-клеток у больных КРР является важным и актуальным для понимания патогенеза этого заболевания и создания эффективных подходов в иммунотерапии.

Цель исследования. Изучение популяции Трег-лимфоцитов и определение роли CD39⁺ Трег-клеток в иммунной супрессии при развитии КРР.

Задачи исследования:

1. Изучить содержание и фенотипическую гетерогенность циркулирующих Трег-клеток при развитии КРР; определить количество CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, CD8⁺FOXP3⁺ и CD4⁺CD25⁻IL-10⁺ Т-клеток.

2. Оценить функциональное состояние Трег-клеток у больных КРР по уровню экспрессии маркера пролиферации Ki-67, маркера активации ICOS (молекула индуцибельного Т-клеточного ко-стимулятора) и хемокинового рецептора CCR4.

3. Определить уровень мРНК генов *CD39*, *CD73* и *A2AR* для оценки активации аденозин-опосредованной супрессии у больных КРР.

4. Изучить содержание и функциональную активность периферических CD39⁺ Трег-клеток у больных КРР, а также исследовать экспрессию CD39 опухоль-инфильтрирующими Трег-клетками.

5. Оценить степень иммунной супрессии, обусловленной активацией CD39⁺ Трег-клеток и CTLA-4⁺ Трег-клеток у больных КРР.

6. Сравнить особенности активации CD39⁺ Трег-клеток у больных КРР, у больных ревматоидным артритом (РА) и острым панкреатитом (ОП).

Научная новизна. В настоящей работе впервые показано изменение содержания отдельных популяций Трег-клеток в зависимости от стадий заболевания. Установлено, что иммунная супрессия наблюдается у больных КРР уже на ранних этапах заболевания. Обнаружено, что с увеличением числа CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} и CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Трег-клеток содержание CD3⁺CD4⁺ Т-

хелперов у больных КРР снижается. Впервые исследована популяция CD39⁺ Treg-клеток у больных КРР как среди периферических Т-лимфоцитов, так и среди ОИЛ. Показано, что у больных КРР происходит накопление и усиление экспрессии эктонуклеотидазы CD39 Treg-клетками. В работе впервые проведено сравнение уровня активации двух популяций Treg-клеток, экспрессирующих молекулы CD39 и CTLA-4, которые участвуют в разных механизмах иммунной супрессии. Показано сходство в функционировании этих субпопуляций при КРР. В диссертационной работе впервые проведено исследование CD4⁺Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD39 и CTLA-4, при других патологиях, при которых развивается чрезмерный иммунный ответ (РА) или иммунная супрессия, не связанная с канцерогенезом, но сопровождающаяся нарушением иммунной регуляции (ОП).

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе показано усиление функциональной активности Treg-клеток у больных КРР, а также выявлены особенности в уровне CD39-позитивных клеток в сравнении с другими патологиями. Полученные данные расширяют и углубляют существующие представления о состоянии популяции Treg-клеток, а также позволяют оценить роль аденозин-опосредованной иммунной супрессии при развитии КРР. Установленные фенотипические и функциональные отличия Treg-клеток больных КРР указывают на перспективы их использования в разработке методов диагностики и прогнозирования заболевания колоректальным раком. Результаты могут быть применены в образовательном процессе для студентов биомедицинских специальностей.

Апробации результатов. Материалы диссертации были представлены на II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012), Международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2013, 2014), I Международной научной конференции студентов и аспирантов «Cell Technology Week» (Киев, 2013), IX и X Всероссийских конференциях с международным участием «Иммунологические

чтения в г. Челябинске» (г. Челябинск, 2014, 2015), II Всероссийской конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» (г. Пермь, 2015), XV Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 14 публикаций из них 7 статей в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций («Иммунология», «Медицинская иммунология», «Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология», «Вопросы онкологии», «Вестник Российского государственного медицинского университета», «Труды Карельского научного центра РАН»), а также 7 публикаций в сборниках трудов международных и всероссийских конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц, 26 рисунков. Работа содержит главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», а также «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», включающего 200 источников, из них 194 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были лимфоциты периферической крови человека. Группу больных КРР составили 59 человек, возраст которых в среднем был $65 \pm 12,4$ года (от 25 до 83 лет). Онкологические больные, вошедшие в исследование, проходили лечение в ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер». Доля больных раком ободочной кишки составила 59%, а прямой кишки - 40%. Образцы опухолевой ткани были получены после операции 5-ти больных с III стадией КРР. В качестве контроля исследована периферическая кровь 42 здоровых доноров в возрасте $54,4 \pm 20,6$ лет (от 25 до 60 лет). В группу больных РА вошли 20 человек, наблюдавшихся в ревматологическом отделении

ГУЗ «Республиканской больницы имени В.А. Баранова». Все больные РА, средний возраст которых составил $63,0 \pm 10$ лет (от 50 до 68 лет), получали терапию базисными противовоспалительными препаратами. Группа больных ОП составила 29 человек в возрасте $44,5 \pm 18$ лет (от 23 до 79 лет), которые находились на лечении в ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи». Для проведения исследования было получено разрешение Комитета по медицинской этике при Министерстве здравоохранения и социального развития РК и Петрозаводском государственном университете (протокол № 25 от 12.02.2013 г.).

Забор крови у обследованных лиц проводился из локтевой вены вакуумным способом, натошак. У больных КРР и ОП забор крови проводился при первичном обследовании до начала терапии или хирургического вмешательства.

Анализ экспрессии исследуемых молекул лимфоцитами выполнялся на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter, США). Для определения и оценки содержания популяций лимфоцитов были использованы следующие моноклональные антитела: CD4-FITC, CD8-FITC (Beckman Coulter, Франция), CD3-PE, CD16-FITC, CD19-FITC (ООО «Сорбент», Россия). Для характеристики Трег-клеток лимфоциты окрашивали следующими МАТ: CD4-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7, CD278-PE, CCR4-PE, CTLA-4-PE («Beckman Coulter», Франция), IL-10-PE, CD39-PE (R&D Systems, США), FOXP3-PE, Ki-67-PE (eBioscience (США)). Чтобы оценить экспрессию внутриклеточных молекул проводили процедуру пермеабиллизации с помощью набора Intra Prep (Beckman Coulter, Франция) для анализа экспрессии CTLA-4 и IL-10 и набора для детекции FOXP3 (eBioscience, США) для анализа экспрессии FOXP3 и Ki-67.

Выделение и очистку РНК проводили из 200 мкл цельной крови с использованием набора реагентов «AxyPrep Blood Total RNA Miniprep Kit» (Axygen, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Синтез кДНК проводили из 1-2 мкг мРНК с использованием случайных гексапраймеров и MMLV-обратной транскриптазы (ООО «Силекс», Москва). Синтезированная кДНК хранилась при температуре -80 °С.

Амплификацию кДНК, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени выполняли с использованием реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I (ЗАО «Евроген», Москва) на приборе «iCycler Thermal Cycler» («Bio-Rad», США). Оптимальная температура отжига исследуемых генов выбиралась после постановки температурного градиента. В качестве отрицательных контролей использовали реакционную смесь без добавления матрицы. Анализ полученных данных проводили методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001), где Ct – пороговый цикл, а ΔCt – разница между значениями пороговых циклов для референсного и таргетного генов. Итоговый уровень экспрессии исследуемых генов рассчитывали относительно контроля (здоровые доноры), принимая величину экспрессии каждого исследуемого гена в контроле за единицу.

Процедуру выделения ОИЛ выполняли по модифицированной методике Whiteside T.L. (Whiteside T.L., 2001). Материал измельчали, переносили в среду для ферментативной дезагрегации, приготовленную на основе RPMI-1640 с добавлением 10% FBS (эмбриональная телячья сыворотка), 100 мкг/мл гентамицина и 1 мг/мл коллагеназы IV, и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 2-3 часов при комнатной температуре. Полученную суспензию пропускали через стерильные фильтры для клеток 70 и 40 мкм, промывали 2 раза средой RPMI-1640 с 5% FBS, центрифугируя 5 минут при 250g. ОИЛ отделяли от опухолевых клеток центрифугированием на отдельном градиенте фикола (Whiteside T.L., 1986; Wertel et al., 2015). Суспензия клеток наслаивалась в соотношении 1:1 на градиент, образованный наложением слоя 100% Ficoll-Raque (ООО НПП «Панэко», Москва) с равным объемом 75% Ficoll-Raque в RPMI-1640 плотностью 1,055 г/см³. Далее образцы центрифугировали в течение 35 минут при комнатной температуре с ускорением 400g. Обогащенная мононуклеарными клетками (МНК) фракция, которая формировалась на границе раздела 75% и 100% фикола, отбиралась, промывалась и анализировалась на проточном цитометре.

Для определения влияния супернатанта разрушенных опухолевых клеток на экспрессию CD39 у здоровых доноров фракцию МНК выделяли из цельной венозной крови здоровых доноров центрифугированием на градиенте Ficoll-Paque плотностью 1,077 г/см³. Концентрацию жизнеспособных клеток определяли окрашиванием небольшого количества суспензии 0,2% раствором трипанового синего (Sigma, США) и подсчетом клеток в камере Горяева. Для получения супернатанта опухолевой ткани 100 мг материала гомогенизировали и добавляли 2 мл полной питательной среды. Далее полученную суспензию центрифугировали 5 минут при 500g и отбирали супернатант, который добавляли к клеткам в количестве 10 мкл и 50 мкл на лунку. МНК, выделенные из периферической крови здоровых доноров, вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве 5×10^4 клеток, дополняли полной питательной средой до объема 300 мкл, 10 нг/мл раствора IL-2 (Miltenyi Biotec, США) и стимулировали анти-CD3 мАТ (Miltenyi Biotec, США) в концентрации 10 мкг/мл. Инкубация проводилась в CO₂-инкубаторе (ShellLab, США) при температуре 37 °С и 5% уровне CO₂ в течение 48 часов. Клетки, культивируемые без супернатанта опухоли, рассматривались как контрольный образец. После культивирования МНК окрашивали в течение 20 минут мАТ к CD4, CD25, CD45 (Beckman Coulter, Франция), CD39 (R&D Systems, США) и соответствующими изотипическими контролями, промывали и анализировали на проточном цитометре.

Статистическую обработку результатов, полученных в ходе исследования, проводили с использованием программ GRAPH Pad Prism 6.0. Для сравнения двух независимых групп использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Вилкоксона, Спирмена. Различия между группа считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Данные представлены как $M \pm SD$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Популяция Treg-клеток при развитии колоректального рака

Содержание и гетерогенность популяции Treg-клеток. Популяция регуляторных Т-клеток гетерогенна и включает в себя клетки разного

происхождения. В работе оценивали содержание $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$, $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, $CD8^+FOXP3^+$ и $CD4^+CD25^+IL-10^+$ Treg-клеток в периферической крови.

Обследованные нами больные КРР характеризовались повышенным количеством циркулирующих Treg-клеток. Увеличение содержание $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ Treg-клеток происходит только на I-II стадиях развития КРР, тогда как у больных на поздних стадиях (III-IV) количество этих клеток достоверно не отличалось от контроля. Содержание $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg-клеток было увеличено в обеих группах больных (рис. 1). Накопление $CD8^+FOXP3^+$ Treg-клеток наблюдалось на всех стадиях развития болезни, в особенности на III-IV стадиях КРР. Достоверные различия в количестве этих клеток были получены и в группах больных с начальными и поздними стадиями КРР (рис.1). Содержание T_h1 клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+IL-10^+$ также увеличено у обследованных онкологических больных на всех стадиях, по сравнению с контролем (контроль: $0,28 \pm 0,1\%$, КРР: $0,68 \pm 0,5\%$ при $p < 0,01$).

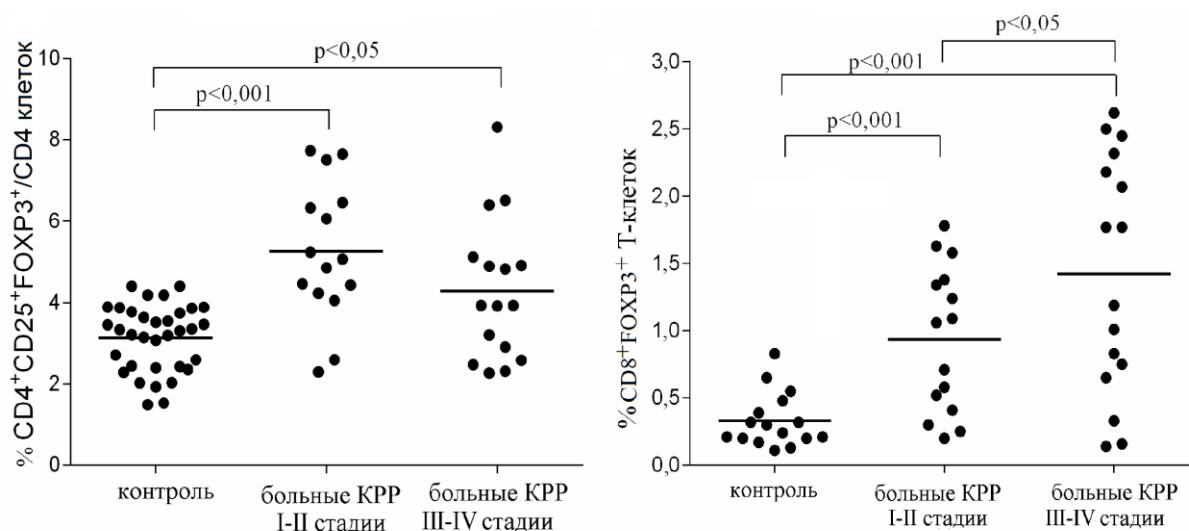


Рисунок 1. Содержание клеток с фенотипами $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ и $CD8^+FOXP3^+$ в периферической крови больных КРР и здоровых лиц

В литературе отмечается, что рост опухоли может сопровождаться формированием условий для привлечения, индукции и генерации Treg-клеток (Tanaka and Sakaguchi, 2017). Вероятно, $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg-клетки играют

более важную роль на периферии в начальный период развития опухоли, тогда как на более поздних стадиях могут принимать участие в поддержании иммунной супрессии CD8⁺FOXP3⁺ Treg-клетки и CD4⁺CD25⁺IL-10⁺ Tr1-клетки.

Функциональная активность периферических Treg-клеток. Пролиферативную активность Treg-клеток оценивали по количеству лимфоцитов, несущих ядерный белок Ki-67, являющийся маркером клеток, начавших деление. Степень активации анализировали по экспрессии ко-стимулирующего рецептора ICOS. Кроме того, исследовали экспрессию хемокинового рецептора CCR4, для оценки способности к миграции в направлении хемокина CCL22, являющегося одним из основных способов привлечения Treg-клеток в места локализации опухоли (Mougiakakos, 2011). В результате исследования функциональной активности Treg-клеток при КРР нами было обнаружено усиление пролиферации, активации и миграции супрессорной популяции.

Показано, что больные КРР отличаются повышенным содержанием ($p < 0,05$) в периферической крови Ki-67⁺ Treg-клеток, ICOS⁺ Treg-клеток и CCR4⁺ Treg-клеток по сравнению с контролем (рис. 2). Различий между стадиями не наблюдалось. Отмечено, что активированные CD25⁺ Т-хелперы тех же больных не имели такой закономерности: относительное количество Ki-67⁺ CD4⁺CD25⁺ и ICOS⁺ CD4⁺CD25⁺ Т-клеток у больных КРР было на уровне контроля, а относительное количество CCR4⁺CD4⁺CD25⁺ Т-клеток было выше, чем в контроле ($p < 0,001$).

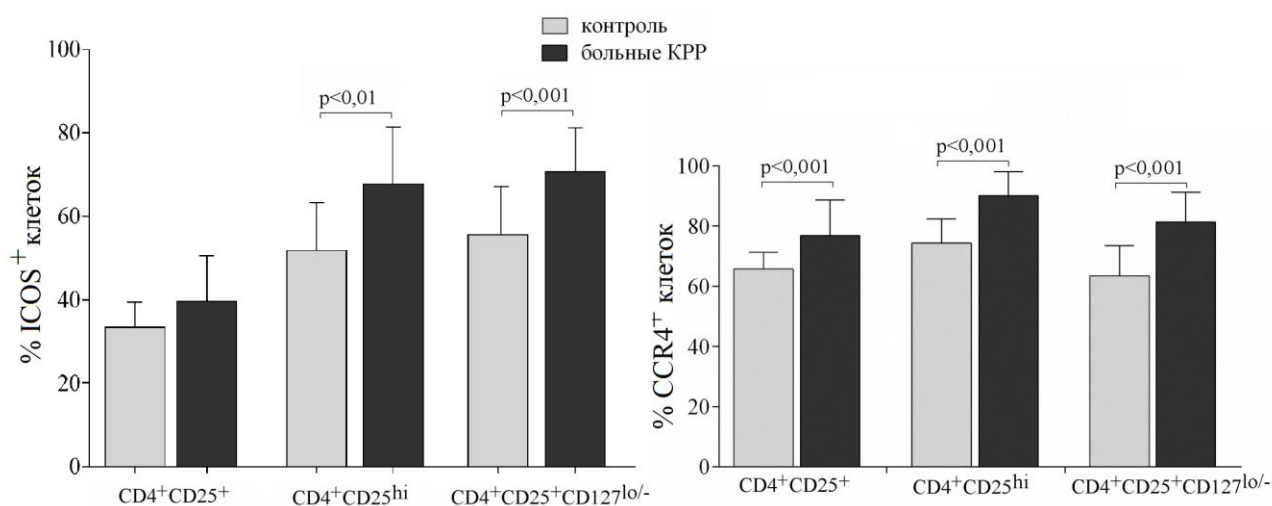


Рисунок 2. Относительное содержание ICOS⁺ и CCR4⁺ клеток в популяциях CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} клеток у больных КРР и здоровых доноров

Количество Treg-клеток и изменения в популяционном составе периферических лимфоцитов. Важной характеристикой состояния иммунной супрессии являются соотношения в количестве основных популяций циркулирующих лимфоцитов. При развитии КРР значительные изменения происходят в субпопуляционном составе Т-клеток (табл. 1). При анализе данных обнаружена отрицательная корреляция между содержанием CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов и содержанием Treg-клеток: для Tregs с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} $r = -0,47$ при $p < 0,01$, а для Tregs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ значение r составило $-0,54$ при $p < 0,01$.

Таблица 1. Содержание основных популяций лимфоцитов в периферической крови здоровых доноров и больных с разными стадиями КРР, % от общего числа лимфоцитов.

Фенотипы	Контроль (n=20)	Больные КРР	
		I-II стадии (n=21)	III-IV стадии (n=26)
CD3 ⁺ (Т-клетки)	69,26±5,3	66,96±6,4	64,02±6,4*

Продолжение таблицы 1

Фенотипы	Контроль (n=20)	Больные КРР	
		I-II стадии (n=21)	I-II стадии (n=21)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (Т-хелперы)	42,39±6,4	32,80±9,5**	35,66±5,9**
CD4 ⁺ CD25 ⁺ (активированные Т-хелперы)	10,74±5,2	6,46±2,7**	5,57±1,8**
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (ЦТЛ)	21,98±4,7	31,45±6,1**	27,28±6,5**#
CD3 ⁻ CD19 ⁺ (В-лимфоциты)	11,15±3,0	8,13±4,3*	5,99±2,8**
CD3 ⁻ CD16 ⁺ (NK-лимфоциты)	14,84±5,7	13,39±4,8	15,56±8,5
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (иммунорегуляторный индекс)	2,07±0,5	1,12±0,5**	1,40±0,4**

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$, ** - различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,01$, # - различия достоверны по сравнению с больными с I-II стадиями при $p < 0,05$.

Полученные нами результаты о снижении содержания некоторых основных популяций лимфоцитов на более поздних стадиях заболевания свидетельствуют о том, что у больных КРР в процессе канцерогенеза происходит ослабление иммунной реакции. Повышенное содержание Treg-лимфоцитов, усиление их функциональной активности указывает на то, что они могут участвовать в супрессии Т-клеточного иммунитета.

Активация аденозин-опосредованной супрессии при развитии КРР

Изменение уровня экспрессии мРНК генов CD39, CD73 и A2AR у больных КРР.
Для оценки активации аденозин-опосредованного механизма иммунной супрессии у больных КРР исследовали относительное содержание мРНК генов

CD39 и *CD73* (кодируют ферменты, катализирующие дефосфорилирование АТФ до аденозина), а также гена аденозинового рецептора *A2AR* (стимуляция продукта этого гена – рецептора *A2A*, оказывает иммуносупрессорное действие). Оказалось, что у больных КРР значительно изменяется уровень мРНК *CD39*, который увеличивался в процессе развития заболевания (рис. 3). При оценке экспрессии лейкоцитами мРНК гена *CD73* не обнаружено достоверных различий в группе больных КРР и здоровых доноров. Значительное повышение экспрессии мРНК *A2AR* отмечено на поздних стадиях заболевания.

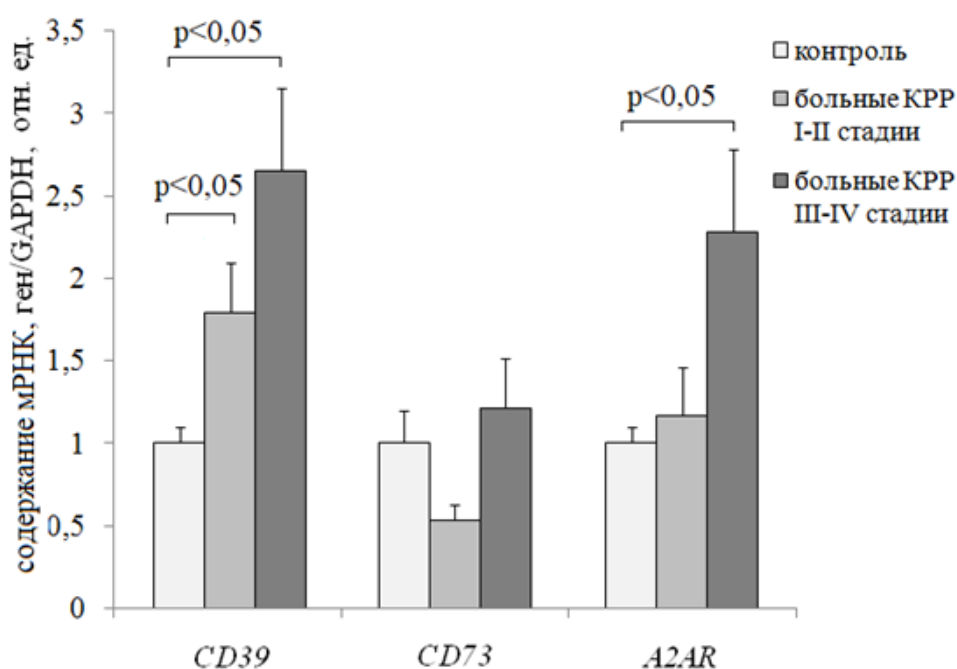


Рисунок 3. Относительный уровень мРНК *CD39*, *CD73* и *A2AR* в лейкоцитах периферической крови больных на разных стадиях КРР, нормализованный по мРНК *GAPDH*

Содержание *CD39*⁺ лимфоцитов в периферической крови больных при развитии КРР. У здоровых доноров и больных КРР популяция Тreg-клеток (*CD4*⁺*CD25*^{hi} и *CD4*⁺*CD25*⁺*CD127*^{lo/-}) в отличие от *CD4*⁺*CD25*⁺ и *CD4*⁺*CD25*⁻ Т-клеток содержит значительно больше *CD39*⁺ клеток. Относительное содержание *CD39*-позитивных Тreg-клеток (*CD4*⁺*CD25*^{hi} и *CD4*⁺*CD25*⁺*CD127*^{lo/-}) увеличивается уже на начальных стадиях развития опухоли (рис. 4). Максимальных значений оно достигает у больных с III-IV стадиями КРР (66,3±15,5%) и достоверно отличается от уровня контроля и от I-II стадий КРР.

Обнаружена положительная корреляция между экспрессией CD39 на CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клетках и уровнем мРНК A2AR ($r=0,45$ при $p=0,039$) у больных КРР.

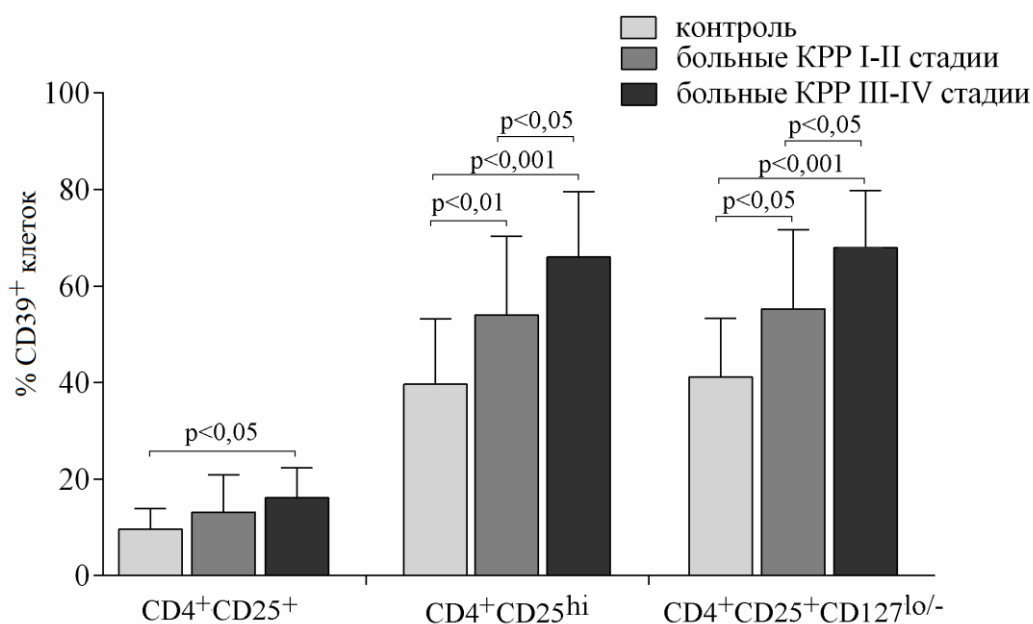


Рисунок 4. Относительное содержание CD39⁺ клеток в популяциях CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} Т-клеток при развитии КРР

Таким образом, для оценки роли аденозин-опосредованной супрессии на периферии у больных КРР в настоящей работе проанализировали относительное содержание мРНК молекул-участников аденозин-опосредованной супрессии. К ним относятся эктонуклеотидазы CD39 и CD73, которые дефосфорилируют АТФ до аденозина, а также A2AR, клеточный рецептор, играющий важную роль в иммуносупрессорном эффекте в популяции лимфоцитов. Согласно полученным данным по уровню мРНК CD39 и оценки экспрессии этой эктонуклеотидазы CD4⁺ Т-клетками, периферические лимфоциты больных КРР могут активно участвовать в расщеплении АТФ до АМФ. Изменение в содержании мРНК A2AR, наблюдаемое нами, наряду с ослаблением клеточного иммунитета у больных КРР (табл. 1.) говорит об активации аденозин-опосредованной супрессии, в которой значительная роль может принадлежать Тreg-клеткам.

Функциональная активность $CD4^+CD39^+$ Treg-клеток у больных КРР. С целью оценки связи между уровнем экспрессии эктонуклеотидазы и уровнем экспрессии молекул, отражающих степень функционирования Treg-клеток (FOXP3, Ki67, ICOS и CCR4) проводили корреляционный анализ. Показано, что между экспрессией CD39 и экспрессией транскрипционного фактора Treg-клеток FOXP3 на $CD4^+$ и на $CD4^+CD25^{hi}$ Т-клетках больных КРР существует прямая корреляция ($r=0,47$ при $p=0,006$ и $r=0,51$ при $p=0,003$, соответственно). В таблице 2 представлен результат анализа связи экспрессии CD39 с другими функциональными молекулами.

Таблица 2. Коэффициент корреляции уровня экспрессии CD39 и уровня экспрессии молекул Ki-67, ICOS и CCR4 лимфоцитами больных КРР

	Значение коэффициента корреляции Спирмена, r_s (уровень достоверности, p) для экспрессии молекул:		
	CD39 и Ki-67	CD39 и ICOS	CD39 и CCR4
$CD4^+CD25^+$	0,21 (0,281)	0,31 (0,201)	0,68 (0,0002)
$CD4^+CD25^{hi}$	0,46 (0,016)	0,52 (0,012)	0,20 (0,356)
$CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$	0,49 (0,009)	0,53 (0,012)	0,38 (0,065)

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные значения коэффициента корреляции

Обнаружено, что у больных КРР между количеством $CD39^+$ клеток и количеством $Ki-67^+$ и $ICOS^+$ клеток в популяции Treg-клеток ($CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$) существует положительная корреляция. Это может свидетельствовать об активации и экспансии $CD39^+$ Treg-клеток. Следует отметить, что у здоровых доноров отсутствует корреляция между количеством $CD39^+$ клеток и количеством $Ki-67^+$, $ICOS^+$ или $CCR4^+$ в популяциях $CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ Treg-клеток.

Содержание CD39⁺ лимфоцитов среди опухоль-инфильтрирующих клеток. Известно, что многие опухолевые клетки экспрессируют CD39 и CD73 для генерации внеклеточного аденозина и создание иммуносупрессорной среды в своем микроокружении (Antonioli et al., 2013). Однако вопрос о влиянии растущей опухоли на экспрессию CD39 лимфоцитами в литературе освещен слабо. В связи с этим в работе были проанализированы лимфоциты, выделенные из опухолевой ткани 5 больных первичным КРР III стадии. Обнаружено, что в опухолевой ткани среди лимфоцитов количество CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих CD39, в 4 раза выше, чем в периферической крови тех же больных (рис. 4). Повышенное содержание CD4⁺CD39⁺ Т-клеток было отмечено и среди CD4⁺ Т-лимфоцитов. Также увеличение числа CD39⁺ клеток среди ОИЛ наблюдалось и в популяции Т-клеток, не несущих на своей поверхности CD4. При этом доля CD39⁺CD4⁻ клеток была больше, чем CD4⁺CD39⁺ ($p<0,05$) в опухолевой ткани, чего не отмечено среди лимфоцитов, циркулирующих в крови (рис. 5).

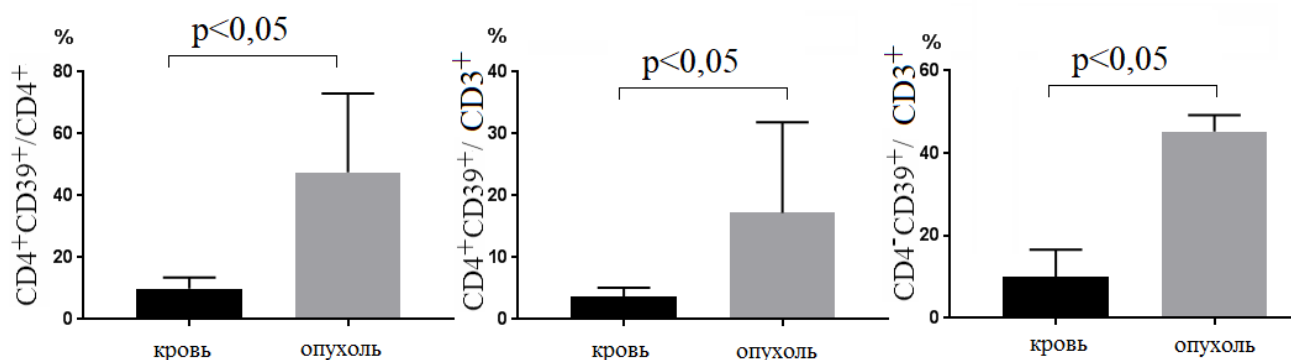


Рисунок 5. Относительное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD39, в периферической крови и опухолевой ткани больных КРР

Опухоль-инфильтрирующие CD4⁺CD25^{hi} Treg-клетки также отличались от периферических высокой экспрессией эктонуклеотидазы CD39 ($p<0,05$). Кроме того, повышенная экспрессия этой молекулы наблюдалась и для клеток с фенотипом, не характерным для Treg-клеток (CD4⁺CD25⁻ и CD4⁺CD25⁺).

В связи с полученными данными можно предположить, что опухолевое микроокружение стимулирует экспрессию CD39 лимфоцитами, находящимися в

неопластической ткани. Для проверки этого предположения исследовали воздействие супернатанта опухолевой ткани, который добавляли в лунки 96-луночного планшета в количестве 10 мкл и 50 мкл, содержащие 5×10^4 МНК здоровых доноров ($n=6$). При добавлении 50 мкл было отмечено достоверное увеличение числа этих клеток в клеточной суспензии по сравнению с МНК, культивируемыми в обычной среде. Однако при оценке содержания $CD39^+$ клеток в популяциях $CD4^+CD25^{hi}$, $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^-$ клеток достоверных различий не выявлено. Полученные данные свидетельствуют о влиянии опухолевого микроокружения на экспрессию $CD39$ $CD4^+$ Т-лимфоцитами.

Изменение активации $CD39^+$ и $CTLA-4^+$ Treg-клеток при развитии КРР

В работе проводили сравнительное исследование активации Treg-клеток, экспрессирующих $CD39^+$ и другую важную для Treg-опосредованной иммунной супрессии молекулу, $CTLA-4$.

В группе КРР наблюдалось повышенное количество $CD4^+CTLA-4^+$ клеток как по сравнению с контролем, так и по сравнению с числом $CD4^+CD39^+$ Т-клеток тех же больных. Treg-клетки больных ($CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$) также отличались повышенным содержанием $CTLA-4^+$ клеток. Так, количество $CTLA-4^+$ клеток среди $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ Treg-клеток больных КРР составило $59,41 \pm 11,3\%$, что на 16,5 % было выше контроля ($42,88 \pm 4,4\%$, $p < 0,05$). В отличие от $CD39^+$ клеток (рис. 4), достоверных различий между ранними и поздними стадиями КРР в количестве $CTLA-4^+$ Treg-клеток не обнаружено.

Обнаружена высокая положительная корреляция между числом $CTLA-4^+$ и $FOXP3^+$ клеток среди $CD4^+$ Т-клеток, ($r=0,71$ при $p < 0,001$), также как и для молекулы $CD39$. Как и в случае с эктонуклеотидазой $CD39$ (табл. 6), у больных КРР между содержанием $CTLA-4^+$ и содержанием $Ki-67^+$ ($r = 0,51$ при $p=0,008$), $ICOS^+$ клеток ($r = 0,73$ при $p=0,002$) в популяции Treg-лимфоцитов существовала положительная корреляция, но не для молекулы $CCR4$. Но корреляции между содержанием $CTLA-4^+$ клеток и $CD39^+$ клеток среди Treg-клеток ($CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$) нет.

Проведен анализ содержания CD4⁺CD39⁺/CD4⁺CTLA-4⁺ Treg-клеток с количеством Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток, результаты которого представлены в таблице 3. Вероятно, CTLA-4⁺ Treg-клетки, и CD39⁺ Treg-клетки участвуют в иммуносупрессии при развитии КРР. Возможно, CD39⁺ Treg-клетки оказывают более глубокое влияние на состояние клеточного звена иммунитета.

Таблица 3. Коэффициент корреляции содержания Treg-клеток (CD4⁺CD39⁺, CD4⁺CTLA-4⁺) и CD3⁺ Т-клеток, CD19⁺ В-клеток, CD16⁺NK-клеток.

	CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺		CD4 ⁺ CD39 ⁺	
	r	p	r	p
CD3 ⁺ CD19 ⁻	-0,02	0,894	-0,10	0,569
CD3 ⁺ CD4 ⁺	-0,44	0,022	-0,60	0,0003
CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,20	0,324	0,33	0,065
CD3 ⁻ CD19 ⁺	-0,31	0,148	-0,40	0,044
CD3 ⁻ CD16 ⁺	0,16	0,404	0,05	0,802
ИРИ	-0,32	0,123	-0,58	0,0007

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные значения коэффициента корреляции

Активация CD39⁺ Treg-клеток при различных патологиях

Была изучена активация CD39⁺ Treg-клеток при других патологиях, связанных с воспалением и сопровождающихся нарушениями в регуляции иммунитета. Treg-клетки исследовали в условиях развития иммунной супрессии, не связанной с канцерогенезом – больные ОП, и в условиях аутоиммунизации – больные РА. Такие заболевания характеризуются разными моделями функционирования Treg-клеток. В первом случае механизмы иммунной супрессии активированы, может наблюдаться гиперфункционирование Treg-клеток, во втором случае, при чрезмерном иммунном ответе происходит ограничение механизмов иммунной супрессии, что может сопровождаться гипофункционированием Treg-клеток.

Больные РА не отличались от контроля содержанием $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ Treg клеток (РА: $5,15 \pm 2,07\%$ от $CD4^+$ Т-клеток, контроль: $4,56 \pm 1,0\%$), тогда как у больных с иммуносупрессорным состоянием обнаружено повышенное содержание этих клеток (ОП: $6,87 \pm 2,7\%$, $p < 0,01$ и КРР: $5,54 \pm 1,8\%$, $p < 0,05$). В группах больных РА и КРР доля $CD39^+$ клеток была повышена как среди $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ Treg-клеток, так и среди активированных $CD4^+CD25^+$ Т-хелперов (рис. 6). А в группе больных ОП повышенное содержание клеток, экспрессирующих $CD39$, отмечено только для Treg-клеток.

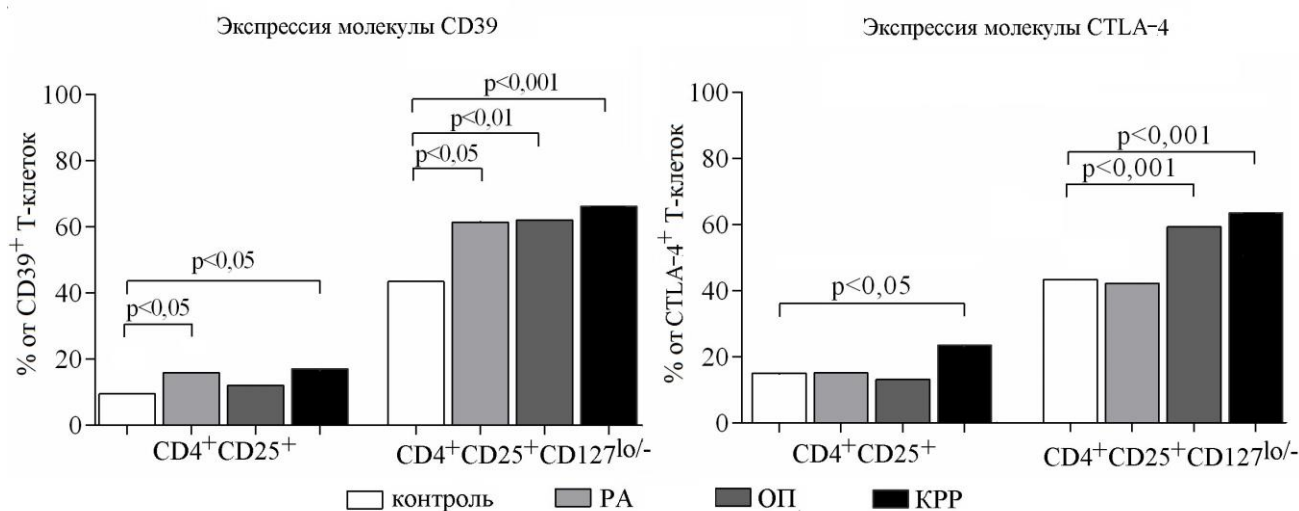


Рисунок 6. Относительное содержание $CD39^+$ и $CTLA-4^+$ клеток в популяциях $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ Т-клеток у здоровых лиц и у больных РА, ОП, КРР

Возможно, увеличение количества $CD39^+CD4^+CD25^+$ и $CD39^+CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ Т-клеток при РА, связано с хроническим течением воспалительного процесса, поскольку у больных с панкреатитом, острым воспалительным заболеванием, такой картины не наблюдалось. С другой стороны, увеличение $CD39$ на поверхности Т-лимфоцитов больных РА может быть вызвано действием метотрексата, который получали обследованные нами больные. В литературе отмечается, что противовоспалительное действие метотрексата в низких дозах, возможно связано с продукцией внеклеточного аденозина (Brown et al., 2016). Об этом свидетельствует и отсутствие различий в

содержании CTLA-4⁺ Treg клеток (рис. 6) у больных РА и контролем. В связи с этим оценка роли CD39⁺ Treg-клеток при РА оказалась затруднена.

У больных ОП обнаружено повышенное содержание Treg-клеток и увеличенная доля CD39⁺ клеток среди них, поэтому в настоящей работе определяли изменения в содержании основных популяций лимфоцитов крови и корреляцию этих изменений с числом CD4⁺CD39⁺ T-клеток у этих больных. Оказалось, что при ОП, также как и при КРР, наблюдаются признаки ослабления иммунитета, касающиеся прежде всего CD4⁺ T-клеток. Однако при ОП, в отличие от КРР, не обнаружено ни одной достоверной корреляции между содержанием CD4⁺CD39⁺ Treg-клеток, а также уровнем экспрессии этой молекулы на CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} Treg-клетках и количественными изменениями в популяционном составе лимфоцитов. Вероятно, у больных ОП Treg-клетки, экспрессирующие эту эктонуклеотидазу, не вносят значительного вклада в системную иммуносупрессию, как это происходит при канцерогенезе, а развитие состояния иммунной супрессии у таких больных происходит как компенсаторный механизм, ограничивающий степень развития воспалительной реакции.

ВЫВОДЫ

1. Развитие КРР характеризуется накоплением отдельных популяций Treg-клеток (CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, CD8⁺FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺IL-10⁺) в периферической крови. Для CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} и CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg-клеток свойственно увеличение числа на начальных стадиях развития заболевания, а повышение количества CD8⁺FOXP3⁺ происходит на более поздних этапах КРР.
2. Увеличение уровня экспрессии молекул Ki-67, ICOS и CCR4 на CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} и CD4⁺CD25^{hi} клетках свидетельствуют о повышении функциональной активности Treg-клеток при КРР.
3. Увеличение числа CD4⁺CD39⁺ Treg-клеток происходит на поздних стадиях развития заболевания, тогда как повышенный уровень экспрессии эктонуклеотидазы CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} Treg-клетками характерен уже для I-

- II стадий заболевания. У больных КРР существует положительная корреляция между уровнем экспрессии CD39 и экспрессией функциональных молекул FOXP3, Ki-67 и ICOS на CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} Treg-клетках.
4. Активными участниками аденозин-опосредованной супрессии являются Treg-клетки, о чем свидетельствует положительная корреляция между содержанием мРНК ингибиторного рецептора A2A в лейкоцитах и экспрессией молекулы CD39 Treg-клетками, но не CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ T-клетками у больных КРР.
 5. Опухолевое микроокружение может стимулировать экспрессию эктонуклеотидазы CD39 CD4⁺ T-лимфоцитами. Это проявляется в повышенном содержании CD4⁺CD39⁺ T-клеток среди опухолеинфильтрирующих лимфоцитов и увеличенной экспрессии CD39 не только CD4⁺CD25^{hi} Treg-клетками, но и CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ T-клетками. Также об этом свидетельствует увеличенное количество CD4⁺CD39⁺ T-клеток здоровых доноров в культуре с супернатантом опухоли.
 6. Выявлены схожие тенденции в активации и функционировании CD39 и другой молекулы иммунной супрессии CTLA-4 на Treg-клетках при развитии КРР, а именно: повышение количества, уровня экспрессии у больных КРР, существование прямой корреляции с молекулами FOXP3, Ki-67, ICOS, и обратной корреляции с содержанием в крови CD3⁺CD4⁺ T-клеток.
 7. В отличие от больных КРР, при ОП содержание CD4⁺CD39⁺Treg-клеток остается на уровне контроля. У таких больных нет корреляции между количественными изменениями популяций лимфоцитов и уровнем экспрессии CD39 на CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} Treg-клетках.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Жулай Г.А., Олейник Е.К. Регуляторные Т-лимфоциты CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Перспективы применения в иммунотерапии // Труды Карельского научного центра РАН. 2012.–№2. – С. 3-17
2. Zhulai G.A., Oleinik E.K., Oleinik V.M., Barysheva O. Yu., Churov A.V., Kravchenko P.N., Kuchin A.A. Assay of the level of regulatory T cell activation in cancer and autoimmunity // Cell Technology Week 2013: abstracts book of the I International Scientific Conference of Students and PhD Students (14-17 May, 2013, Kiev, Ukraine). – Kiev, 2013. – С. 67.
3. Жулай Г.А., Олейник Е.К. Регуляторные Т-клетки и канцерогенез // Иммунология. 2013.–Т. 34, №1. – С.61-64
4. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Головин А.В., Чуров А.В., Кравченко П.Н., Олейник В.М. Определение лимфоцитов с Treg-ассоциированными фенотипами в периферической крови больных колоректальным раком // Российский иммунологический журнал. 2014. – Т.8., №2. – С. 57-59
5. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Кравченко П.Н., Чуров А.В., Олейник В.М., Головин А.В., Толлер В.А., Островский А.Г. Анализ клеточного иммунитета при патологиях, сопровождающихся развитием иммунной супрессии // Труды Карельского научного центра РАН. 2014. –№ 5. – С. 228-233
6. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Островский К.А., Олейник В.М., Кравченко П.Н., Чуров А.В. Субпопуляционный состав лимфоцитов как показатель иммунной супрессии при остром панкреатите // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2014. – вып. 109, №9. – С.21-25
7. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Олейник В.М., Чуров А.В., Кравченко П.Н. Фенотипическая характеристика циркулирующих регуляторных Т-клеток у больных колоректальным раком // Медицинская иммунология. 2015. – Том 17, № 3s Специальный выпуск. – С. 159-160
8. Жулай Г. А., Олейник Е. К., Олейник В. М., Кравченко П. Н., Чуров А. В., Островский К.А. CTLA-4⁺ и CD39⁺ Treg-клетки у больных острым

- панкреатитом // Российский иммунологический журнал. 2015. –Т. 9 (18), № 2 (1). – С.231-233.
9. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Романов А.А., Олейник В.М., Чуров А.В., Кравченко П.Н. Циркулирующие регуляторные Т-клетки и изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов у больных колоректальным раком // Вопросы онкологии. 2016. – Том 62, №1. – С. 96-100.
10. Жулай Г.А., Чуров А.В., Кравченко П.Н., Романов А.А., Олейник Е.К., Олейник В.М. CD39⁺ Treg-клетки и сигнальный путь аденозин-A2A-рецептор в развитии иммунной супрессии при колоректальном раке // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 18 - 22 апреля 2016 г.). Сборник тезисов. Пущино. 2016, С. 262-263
11. Жулай Г.А., Чуров А.В., Олейник Е.К., Романов А.А., Кравченко П.Н., Олейник В.М. Экспрессия эктонуклеотидазы CD39 CD4⁺ Т-клетками больных колоректальным раком // Редакционная с. Секция V. БИОЛОГИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ. Успехи молекулярной онкологии. 2016. – Т. 3, № 4. – С. 63-64.
12. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Чуров А.В., Романов А.А., Кравченко С.П.Н., Олейник В.М. Роль Treg-клеток в аденозин-опосредованной иммунной супрессии при колоректальном раке // Медицинская иммунология. 2017. – Т. 19., № 1. – С. 89-94.
13. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Чуров А.В., Романов А.А., Кравченко С.П.Н., Олейник В.М. Участие CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в формировании иммунной супрессии у больных колоректальным раком // Медицинская иммунология. 2017. – Том 19, Специальный выпуск. – С. 159.
14. Жулай Г.А., Чуров А.В., Олейник Е.К., Романов А.А., Семакова П.Н., Олейник В.М. Активация CD4⁺CD39⁺ Т-клеток при колоректальном раке // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2018. – № 3. – С. 49-55.