

На правах рукописи

ХАКИМОВА ГУЛНОЗ ГОЛИБОВНА

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
РАКА ЖЕЛУДКА**

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научные руководители:

доктор медицинских наук
доктор биологических наук

Трякин Алексей Александрович

Заботина Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты:

Титов Константин Сергеевич, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой хирургии и онкологии факультета непрерывного образования медицинского института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Семиглазова Татьяна Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая - ведущий научный сотрудник научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации; заведующая отделением реабилитации федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «05» ноября 2020 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2020 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рак желудка (РЖ) занимает пятое место среди онкологических заболеваний (1 313 000 случаев) и является третьей причиной смертности от рака (819 000 случаев смерти) в мире. В настоящее время, стандартными клинико - морфологическими факторами, позволяющими прогнозировать течение рака желудка, остаются такие параметры как: размер опухоли, количество пораженных регионарных лимфатических узлов, степень злокачественности, тип по Lauren, статус MSI; экспрессия гена Her2neu, генов вируса Эпштейн-Барр. Разработаны оптимальные и эффективные лечебные алгоритмы для каждой конкретной стадии заболевания с учетом ключевых морфологических, клинических и молекулярно-биологических факторов. Вместе с тем, отдаленные результаты лечения РЖ остаются малоудовлетворительными. В связи с этим, возрастают стремления ученых найти «ключ» к пониманию возможностей патогенетической регуляции процессов роста и дифференцировки злокачественной клетки. Особый интерес представляет оценка роли иммунной системы в контроле опухолевого роста и, соответственно, в прогнозе заболевания. Иммунная система и клетки, инфильтрирующие опухоль, являются объектом активного изучения, поскольку им отводится ключевая роль в формировании противоопухолевого иммунитета. Так, иммунная система способна распознавать опухоль и генерировать как локальный, так и системный иммунный ответ, направленный на подавление опухолевого роста. Кроме того, существует понимание процессов, лежащих в основе взаимодействия клеток опухоли с иммунной системой, в частности известно, что продуктивный иммунный ответ и уничтожение клеток опухоли связаны с активацией CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), а их созревание и цитолитический потенциал находятся под контролем CD4+Т-клеток. Анализ литературы последних лет показал также несомненную прогностическую ценность системных воспалительных индексов, основанных на подсчете соотношений нейтрофилов, лимфоцитов и тромбоцитов в периферической крови пациентов с различными злокачественными опухолями, что позволяет использовать эти показатели в клинической практике на этапе планирования комплексного лечения пациентов с злокачественными

новообразованиями, а также максимально рано выявлять признаки рецидива заболевания. Вопрос о связи между количеством и иммуносупрессорной активностью регуляторных Т-клеток внутри опухоли, состоянием эффекторных и цитотоксических лимфоцитов, а также общим состоянием иммунной системы исследован недостаточно. Неуклонно растущий интерес к изучению процессов, происходящих в месте действия антиген-специфических Т-клеток, привел к накоплению данных о наличии прямой связи между составом и количеством лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TILs), определенных субпопуляций и эффективностью комбинированных методов лечения при злокачественных новообразованиях. Этот факт позволяет рассматривать отдельные субпопуляции TILs как клинические маркеры.

В частности, для значительного числа видов опухолей фактически доказана связь между клиническим прогнозом и соотношением между количеством CD8⁺ Т-клеток и регуляторных Т-клеток (Tregs). Увеличение числа Tregs является неблагоприятным фактором, и напротив, повышение пропорции CD8⁺ Т-клеток повышает вероятность благоприятного исхода. Помимо понимания количества тех или иных клеток и их плотности, важно иметь четкое представление о расположении иммунных клеток - во внутриопухолевой или перитуморальной строме. Чтобы улучшить понимание сложной роли иммунных клеток при РЖ, необходимы дальнейшие исследования с использованием современных высокотехнологичных методов - многопараметровой проточной цитометрии и иммуногистохимии.

Определение закономерностей изменения иммунологических показателей в зависимости от стадии и клинического течения, а также сравнение иммунофенотипов опухоли в процессе лечения у онкологических больных является вызовом и задачей для будущих исследований, что, возможно, позволит усовершенствовать существующие методы лечения злокачественных новообразований.

Цель исследования

Изучить клинко-иммунологические показатели циркулирующих лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у больных раком желудка и установить их прогностическое значение.

Задачи исследования

1. Изучить линейную структуру популяций CD45+ лимфоцитов (Т-клеток с фенотипом CD3+CD19-, В-клеток с фенотипом CD3-CD19+ и NK- лимфоцитов с фенотипом CD3-CD16+56+) в периферической крови и опухолевой ткани у больных раком желудка методом проточной цитометрии.

2. Изучить субпопуляционную структуру Т-клеток (CD3+CD4+, CD3+CD8+) и функциональную активность (CD8+Perforin+; CD16+Perforin+) и их цитотоксического потенциала в периферической крови и опухолевой ткани у больных раком желудка методом проточной цитометрии.

3. Оценить минорные субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+CD25+CD127-; CD8+CD11b-CD28-) и NKT-лимфоцитов (CD3+CD16+CD56+) в периферической крови и опухолевой ткани у больных раком желудка методом проточной цитометрии.

4. Оценить субпопуляции Т-клеток (CD4+) и (CD8+) в опухолевой ткани у больных раком желудка методом иммуногистохимии.

5. Оценить влияние факторов воспаления (нейтрофильно-лимфоцитарного индекса, тромбоцитарно-лимфоцитарного индекса) на показатели общей выживаемости (ОВ) и выживаемости без прогрессирования (ВБП).

6. Провести анализ прогностической и предиктивной значимости иммуноморфологических вариантов опухоли для показателей общей выживаемости (ОВ) и выживаемости без прогрессирования (ВБП) у больных раком желудка при проведении системной терапии.

Методы и методология исследования

В работе использован проспективный клинический материал, полученный из онкологического отделения хирургических методов лечения №6 (абдоминальной онкологии), онкологических отделений лекарственных методов лечения (химиотерапевтических) №3 и №1 НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

С 2017 по 2018 год в исследование включено 45 больных аденокарциномой желудка, ранее не получавших лечение. В зависимости от стадии заболевания,

больные разделены на две исследуемые группы – I группа (25 больных с I-III стадиями), II группа (20 больных с IV стадией). В I группе больные получили хирургическое/комбинированное лечение, во II – химиотерапию.

При проведении исследования использованы:

– многопараметровая (четырёхцветная) количественная проточная цитометрия для анализа субпопуляционной структуры циркулирующих лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, больных раком желудка;

– иммуногистохимический анализ структуры лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, больных раком желудка;

– математические методы анализа и обработки результатов, полученных в ходе проспективного исследования.

Научная новизна

В рамках данной диссертационной работы впервые дано определение 3 основных уровней иммунологических нарушений структуры клеток лимфоидной дифференцировки у больных раком желудка. При проведении сравнительного анализа впервые показано, что структура циркулирующих лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, больных ранними, местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка принципиально отличаются. Определены факторы благоприятного и неблагоприятного прогнозов среди показателей системного и локального иммунитета у больных с ранними, местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка. Показано, что изменения НКТ-клеток имеют разнонаправленный характер: увеличение в опухолевой ткани и напротив, снижение в периферической крови больных I-II групп. Выявлено, что у больных с метастатическим раком желудка низкий уровень цитотоксического и перфоринового потенциалов эффекторных CD16 клеток в опухолевой ткани и CD8 Т-регуляторных клеток в периферической крови до начала химиотерапии свидетельствует о высоком риске и вероятности прогрессирования до 6 месяцев.

Дана многопараметровая характеристика иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови и опухолевой ткани до и в процессе проведения

полихимиотерапии. Определены предикторные и прогностические факторы в отношении показателей выживаемости (ОВ, ВБП) при проведении химиотерапии у больных раком желудка.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные знания о функционировании различных клеток лимфоидной дифференцировки в периферической крови и в опухолевой ткани позволят установить направление генерации иммунных реакций у больных раком желудка на системном и тканевом уровне. Выяснение баланса иммунокомпетентных клеток, контролирующих процессы активации и/или супрессии в сочетании с клинико-морфологическими данными и их взаимосвязи с показателями выживаемости (ОВ, ВБП) послужит основой для определения прогностических и предиктивных факторов клинического течения заболевания и противоопухолевого контроля болезни. Оценка динамики изменения иммунофенотипа периферической крови и опухолевой ткани в процессе химиотерапии позволит определить влияние цитотоксических агентов на субпопуляции лимфоцитов.

Личный вклад

Автор принимала непосредственное участие в постановке целей и задач настоящего исследования. Автор участвовала в процессе проспективного исследования 45 больных раком желудка, анализе иммунологических показателей больных, включенных в исследуемые группы диссертационной работы. Автором лично проведен анализ научной литературы по теме диссертации, по количественной оценке, систематизации и статистической обработке материала. Проведенный автором статистический анализ полученных непосредственных результатов позволил сделать выводы о роли различных популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток в генерации системного и местного иммунологического ответа у больных раком желудка.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («медицинские науки»), области исследования п.2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей,

основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)»).

Положения, выносимые на защиту

1. Структура линейных популяций CD45+ лимфоцитов (Т-клеток с фенотипом CD3+D19-, В-клеток с фенотипом CD3-CD19+ и NK-лимфоцитов с фенотипом CD3-CD16+56+) периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, больных с ранним, местно-распространенным и метастатическим раком (мРЖ) желудка принципиально отличается. Так, в опухолевой ткани больных мРЖ в сравнении с ранним и местно-распространенным РЖ отмечается увеличение NK-лимфоцитов с фенотипом CD3-CD16+56+TILs 6,9% – 3,2%, ($p=0,019$), тогда как в периферической крови больных I группы – В-клеток с фенотипом CD3-CD19+ составив 1,6% против 1,0%, ($p=0,017$).

2. В зависимости от прогрессирования заболевания определены нарушения в структуре лимфоцитов системного и локального иммунитета. У больных с ранними, местно-распространенными формами рака желудка с прогрессированием отмечено статистически значимое снижение CD3+CD19-TILs (72,70% против 86,25%, $p=0,008$) и увеличение CD3-CD16+CD56+TILs (3,80% против 2,80%, $p=0,033$). Однако, достоверных различий в субпопуляционной структуре Т-клеток периферической крови между группами не выявлено.

3. По данным иммуногистохимического анализа, у больных ранними и местно-распространенными формами рака желудка стромальная субпопуляция лимфоцитов представлена CD4+sTILs, CD8+sTILs, величиной соотношения CD4+/CD8+ sTILs, тогда как у больных мРЖ инфильтрация представлена интратуморальной субпопуляцией лимфоцитов.

4. Низкий уровень цитотоксического потенциала CD16+ лимфоцитов (CD16ЦТП) и количества CD16+Perforin+ лимфоцитов в опухолевой ткани (13,2% против 55,7%, $p=0,011$; 0,5% против 4,6%, $p=0,030$), CD8 Т-регуляторных клеток с фенотипом CD8+CD11b-CD28- в периферической крови (5,1% против 12,1%, $p=0,019$) до начала химиотерапии у больных мРЖ ассоциирован с высоким риском и вероятностью прогрессирования до 6 месяцев.

5. После 3-4 курсов химиотерапии у больных мРЖ в опухолевой ткани отмечалось повышение содержания цитотоксического потенциала CD16+клеток и цитотоксических лимфоцитов с фенотипом CD3+CD8+TILs составив 55,7% против 64,7%, $p=0,012$ и 3,1% против 5,4%, $p=0,009$ соответственно.

6. Вероятность достичь длительную ВБП (более 9 месяцев) у больных мРЖ увеличивалась при снижении числа Т-клеток (22,0% против -9,7%, $p=0,012$), НКТ-клеток (207,9% против -13,8%, $p=0,002$) и CD4 Т-регуляторных клеток (190,7% против -25,2%, $p=0,002$) в опухолевой ткани и увеличении эффекторных CD16-клеток (-69,5% против 9,1%, $p=0,013$) в периферической крови.

7. Низкий уровень CD3+CD8+TILs (16,40% против 32,35%, $p=0,010$) и CD8+CD11b-CD28-TILs (25,40% против 54,70%, $p=0,013$) до начала лечения увеличивают вероятность умереть у больных ранними и местно-распространенными формами рака желудка. При мРЖ вероятность умереть повышается при низком уровне CD3+CD19- Т-клеток (65,55% против 78,60%, $p=0,044$) в периферической крови и повышенном содержании CD3+CD16+CD56+TILs (13,80% против 7,65%, $p=0,072$) в опухолевой ткани.

8. При комплексной оценке показателей системного клеточного иммунитета, факторов воспаления, клинических признаков и показателей локального иммунитета, определенных методом проточной цитометрии и иммуногистохимии у больных раком желудка выявлено, что увеличение уровня CD3-CD16+CD56+TILs ухудшает ВБП у больных с ранними, местно-распространенными формами рака желудка и ОБ у больных с метастатическим раком желудка (HR=1,382; 95% ДИ 1,087-1,758, $p=0,08$). Увеличение содержания CD3+CD19-TILs является благоприятным фактором прогноза для ВБП у больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ (HR=0,865; 95% ДИ 0,782-0,957, $p=0,05$). Напротив, увеличение соотношения CD4+/CD8+iTILs является фактором неблагоприятного исхода для ВБП у больных ранним и местно-распространенным РЖ (HR=3,264; 95% ДИ 1,09-9,78, $p=0,035$). В то же время, для больных мРЖ факторами неблагоприятного прогноза для ОБ являются увеличение уровня нейтрофилов в периферической крови (HR=1,64; 95% ДИ 1,12-2,40, $p=0,011$), а также увеличение инфильтрации опухолевой ткани НК-клетками (CD3-

CD16+CD56+TILs) (HR=1,42; 95% ДИ 1,06-1,89, p=0,017). Для ВБП больных мРЖ статистически значимыми являются возраст, уровень нейтрофилов и тромбоцитов.

Внедрение результатов исследования

Результаты работы внедрены в лечебную практику онкологического отделения хирургических методов лечения №6 (абдоминальной онкологии) и лабораторию клинической иммунологии отдела клинико-лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 16 июня 2020 г. с участием лабораторий и отделений ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 2 научные работы в журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания пациентов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов и списка литературы. Объем работы составляет 167 листов машинописного текста и содержит 18 рисунков, 57 таблиц. Список литературы состоит из 187 источников, из них 23 отечественных и 164 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Работа выполнена в онкологическом отделении лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) №3, (заведующий отделением, д.м.н, Мещеряков А.А.) и лаборатории клинической иммунологии отдела клинико-лабораторной диагностики (заведующая лабораторией, д.б.н, Заботина Т.Н.) НИИ клинической онкологии им. акад. РАН И РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Материалы и методы исследования

В основу работы положено проспективное клинико-иммунологическое исследование 45 пациентов раком желудка, которые за период с октября 2017г. по октябрь 2018г. получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России. В исследование со случайным формированием выборки были включены пациенты раком желудка, ранее не получавшие противоопухолевое лечение. Проведен анализ иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевую ткань (TILs) больных РЖ.

Изучались следующие клинические характеристики больных: возраст, гистологическая форма опухоли, степень дифференцировки, классификация Lauren, статус MSI, гиперэкспрессия HER2, локализация опухоли, варианты лечения, степень ожирения. Средний возраст больных с ранними/местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка составил 65 лет и 58 лет соответственно. В группе I пациентам на первом этапе выполнялось хирургическое лечение с последующим проведением адъювантной химиотерапии (ХТ) по показаниям. Анализ иммунного статуса по морфологическому материалу и периферической крови до операции осуществлялся однократно. В группе II обследование больных проводилось через каждые 2-3 курса терапии. Пациентам проводилось 9 двухнедельных циклов ХТ I линии либо 6 трехнедельных курсов с последующим наблюдением до прогрессирования болезни. Анализ иммунного статуса по морфологическому материалу и периферической крови осуществлялся дважды (до начала лечения и после 3-4 курсов химиотерапии). Также выполнен иммуногистохимический анализ исследуемых показателей до начала лечения.

У большинства больных (53,3%) первичная опухоль находилась в теле желудка. Больные из хирургической группы старше 60 лет (в среднем, на 7 лет старше пациентов из группы химиотерапии) и в половине случаев (50%) представлены операбельным местно-распространенным РЖ. В I и II группах, опухоль низко дифференцированная (56% и 60%) и представлена кишечным типом Lauren (64% и 60%). В хирургической группе у 2 пациентов (8%) имел место высокий уровень MSI.

Лабораторные (иммунологические) методы исследований

Иммунологические исследования структуры иммунокомпетентных клеток, а также анализ минорных субпопуляций, включая регуляторные и эффекторные лимфоциты, проводили путем многопараметрового иммунофенотипирования

лимфоидных клеток периферической крови (ПК) и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TILs) (n=45).

Использовали коммерческие наборы моноклональных антител (МКА) к поверхностным дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека, конъюгированных FITC, PE, PE-Cy5, PC5 (BD Biosciences, Becton Coulter). Использовали двух-, трех- и четырех-цветное окрашивание клеток с подбором различных комбинаций следующих реагентов, представленных в таблице 1.

Таблица 1 — Специфичность МКА, используемых в исследовании.

№ п/п	Кластер дифференцировки	Клетки-мишени
1.	CD45	Все лейкоциты
2.	CD3	Зрелые Т-клетки
3.	CD4	Субпопуляция Т-клеток
4.	CD8	Субпопуляция Т-клеток
5.	CD19	В-лимфоциты
6.	CD16	НК-клетки
7.	CD56	НК-клетки
8.	CD11b	Цитотоксические клетки, НК-клетки
9.	CD28	Субпопуляция Т-лимфоцитов
10.	Внутриклеточный перфорин	CD8, CD16 лимфоциты

Цитотоксический потенциал клеток-эффекторов изучали при комбинированном окрашивании поверхностных антигенов в сочетании с окрашиванием внутриклеточного белка перфорина с использованием коммерческой тест-системы, содержащей МКА к внутриклеточному белку перфору (BD Biosciences).

Забор опухолевой ткани проводили в процессе выполнения хирургического этапа лечения. Образцы опухоли гомогенизировали в нестерильных одноразовых контейнерах (Medicons), затем фильтровали через фильтры Filcons с диаметром пор не более 50 мкм. Далее осуществляли иммунофлуоресцентное окрашивание клеток аналогично периферической крови.

Количественный анализ структуры субпопуляций лимфоидных клеток ПК и TILs, проводили на проточном цитометре аналитического типа FACSCalibur (BD Biosciences). При анализе образцов ПК накапливали и анализировали не менее 5000

событий в гейте CD45+/CD14- лимфоцитов. Использовали Dotplot анализ, учитывали относительное число позитивных клеток (%). Для анализа образцов клеточной суспензии из фрагментированной опухолевой ткани накапливали $0,1-2 \times 10^6$ событий для каждого образца и дальнейшим анализом не менее 500-5000 клеток в CD45+гейте. Обработку FSC файлов цитометрических данных проводили с помощью программного пакета WinMDI версия 2.8.

Лабораторные (иммуногистохимические) методы исследований

Фиксированные формалином 45 образцов из парафиновых тканей последовательно разрезали на срезы толщиной 4 мкм. Использовались следующие первичные поликлональные антитела: клон анти-CD4 113 (разведение 1: 200; Sino Biological, BDA, Beijing, PR China) и клон анти-CD8 SP16 (разведение 1:150; Thermo Scientific, Fremont, CA). Количество иммунных клеток определяли отдельно в интратуморальной ткани (iTILs) и перитуморальной ткани (sTILs). Количество иммунных клеток в 10 полях накапливалось и затем усреднялось для расчета среднего числа для 1 компьютеризированного 400×400 микроскопического поля ($0,1590 \text{ мм}^2/\text{поле}$). Подсчет осуществлялся двумя исследователями независимо друг от друга. Оценку клеток проводили независимые патоморфологи, которые не имели доступа к клинико-патологическим данным.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В связи с различиями в прогнозе и тактике лечения, больные с ранним/операбельным, местно-распространенным и метастатическим РЖ проанализированы отдельно.

Медиана наблюдения за больными составила 18,5 мес. [15,2; 20,4]. В I группе – 18,3 мес. [15,2; 19,2], во II - 19,5 мес.[8,7; 22,7]. За время наблюдения умерло 12% (3/25) в I группе и 50% (10/20) – во II ($p=0,007$). Прогрессирование заболевания зарегистрировано у 9 (36%) в I группе и 20 (100%) пациентов во II группе. Общая 1-летняя выживаемость пациентов I группы составила $92,0 \pm 5,4\%$; II группы - $70,0 \pm 10,2\%$. 1-летняя выживаемость без прогрессирования для I и II групп составила $64,0 \pm 9,6\%$ и $10,0 \pm 6,7\%$ соответственно.

Исследование иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови у больных раком желудка

При анализе исходных показателей системного иммунитета в зависимости от стадии заболевания, наличия прогрессирования в рамках I группы и выживаемости больных выявлено, что снижение содержания Т-клеток у больных мРЖ за время наблюдения ассоциировано с ухудшением общей выживаемости, 65,55% против 78,60%, $p=0,044$. Медиана CD3-CD19+ В-клеток оказалась выше у пациентов I группы (1,6%) по сравнению с больными II группы (1,0%, $p=0,017$).

Важнейшим показателем состояния клеточного звена иммунной системы является анализ субпопуляций CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в структуре Т-клеток. Медиана CD3+CD8+ Т-клеток у пациентов I-II стадии была статистически значимо ниже в сравнении с IV стадией – 24,7% против 39,9%, $p<0,016$.

При оценке субпопуляций эффекторных лимфоцитов, содержащих перфорин – CD8+Perforin+ и CD16+Perforin+, и их цитотоксического потенциала отмечено, что содержание CD16+Perforin+ и CD16ЦТП у пациентов II группы статистически значимо выше по сравнению с I группой, составив 19,1% против 12,1% ($p=0,016$) и 81,9% и 66,7% ($p=0,010$) соответственно.

При анализе 3 основных минорных популяций регуляторных клеток лимфоидной дифференцировки отмечено, что для пациентов с ранними формами РЖ характерно статистически значимо более высокое содержание НКТ-клеток с фенотипом CD3+CD16+56+ по сравнению с местно-распространенными и метастатическими формами - 25,1% – 10,7% ($p=0,002$); 25,1% – 11,1% ($p=0,003$). При исследовании числа CD8+ Т-регуляторных клеток, напротив, высокие показатели характерны для больных с IV стадией (11,3%) по сравнению с местно-распространенными (12,3%) и локальными формами РЖ (7,5%, $p=0,07$).

Анализ факторов системного воспаления у больных РЖ

При сравнении медиан показателей системного воспаления, таких как нейтрофильно - лимфоцитарный индекс (НЛИ) и тромбоцитарно - лимфоцитарный индекс (ТЛИ) в периферической крови больных с локальными, местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка, достоверных различий не найдено. Для оценки прогностической значимости индексов на

показатели выживаемости было использовано их разделение на 3 диапазона значений, которые выделяли с учетом 25-75 квартилей.

При проведении однофакторного анализа (ОФА) выявлено негативное влияние уровня ТЛИ (>208,7) на БРВ больных с ранними и местно-распространенными формами рака желудка (HR=0,21, 95%ДИ 0,06-0,72, p=0,013) и НЛИ на ВБП больных с мРЖ (HR=2,80, 95%ДИ 1,36-5,75, p=0,005).

При проведении многофакторного анализа (МФА) независимо значимыми признаками, влияющими на ОВ у больных мРЖ, явились Т-клетки (HR=0,905, 95%ДИ 0,833-0,983, p=0,018) и тромбоциты (HR=1,008, 95%ДИ 1,001-1,014, p=0,020).

Таким образом, увеличение уровня Т-клеток в периферической крови является фактором благоприятного прогноза для общей выживаемости, тогда как возраст, уровень нейтрофилов и тромбоцитов являются негативными прогностическими факторами для выживаемости без прогрессирования больных мРЖ.

Исследование иммунофенотипа TILs у больных РЖ

Анализ структуры TILs больных РЖ показал, что медиана процентного содержания степени инфильтрации лимфоцитами (CD45+CD14-TILs) статистически значимо выше у больных I группы, чем у пациентов II группы – 6,8% против 3,4% (p=0,000), в частности, при I-II ст. в сравнении с IV ст. – 12,10% против 3,40% (p=0,008). Медиана НК-клеток была статистически значимо выше у пациентов II по сравнению с I группой, составив 6,9% против 3,2% (p=0,019), в частности, при I-II ст. против IV ст. – 2,40% и 6,90% (p=0,002). Кроме этого, у больных I группы с признаками прогрессирования (n=9) по сравнению с больными без прогрессирования (n=16) за время наблюдения отмечено снижение Т-клеток (72,70% против 85,60%, p=0,029) и увеличение НК-клеток (3,80% против 2,80%, p=0,033).

Отмечалось большее содержание эффекторных CD16 лимфоцитов у пациентов II группы (4,3%) в сравнении с I группой (0,5%, p=0,002). По мере увеличения стадии заболевания выявлено статистически значимое увеличение медианы эффекторных CD16 лимфоцитов; от I-II к III (0,50% – 0,65%, p=0,001), от I-II к IV (0,50– 4,25%, p=0,025). Аналогичная динамика наблюдалась и у эффекторных CD8 лимфоцитов в I и II группах (7,7% против 1,8%, p=0,002) и CD8ЦТП (16,7% против 4,6%, p=0,034). У

больных с мРЖ в отличие от ранних/местно-распространенных форм РЖ отмечено увеличение NKT-клеток в опухолевой ткани, составив 5,1% - 11,2%, ($p=0,0002$).

Снижение уровня CD3+CD8+TILs и CD8+CD11b-CD28-TILs у больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ ассоциировался с ухудшением показателей 1-летней ОВ по сравнению с их высокими уровнями: 16,40% против 31,25% ($p=0,010$) и 25,40% против 54,70% ($p=0,013$) соответственно. У умерших больных мРЖ по сравнению с остающимися под наблюдением было выше содержание NKT CD3+CD16+CD56+TILs (13,80%-7,65%, $p=0,007$).

При проведении многофакторного анализа выявлено, что увеличение процентного содержания Т-клеток является благоприятным фактором прогноза для БРВ у больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ ($HR=0,865$, 95%ДИ 0,782-0,957, $p=0,005$), а увеличение уровня НК-клеток, напротив, негативно влияет на нее ($HR=1,382$, 95%ДИ 1,087-1,758, $p=0,008$). С помощью ROC-кривых найдены пороговые значения, соответствующие оптимальному соотношению чувствительности и специфичности в определении вероятности прогрессирования. Для Т-клеток пороговое значение – 70%, для НК-клеток – 3% (Рисунок 1).

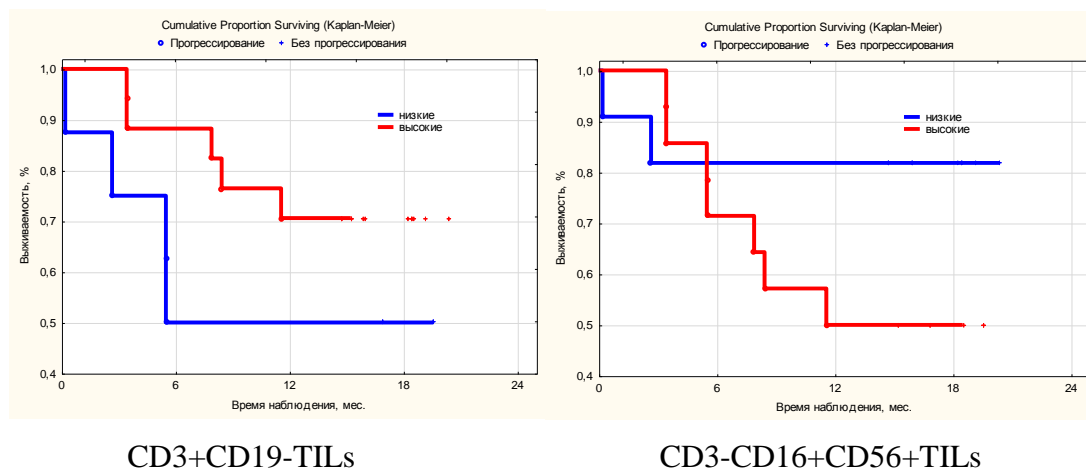


Рисунок 1 – БП в зависимости от уровня Т-клеток (CD3+CD19-TILs) и НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) у больных раком желудка I группы

При исследовании зависимости ОВ и БП больных раком желудка II группы от показателей локального иммунитета было выявлено, что увеличение процентного содержания НК-клеток и NKT-клеток являются неблагоприятными факторами прогноза для ОВ больных метастатическим РЖ ($HR=1,249$; 95% ДИ 0,997-1,564, $p=0,053$, $HR=1,127$; 95% ДИ 1,025-1,239, $p=0,013$ соответственно). С помощью ROC-

кривых найдено пороговое значение только для НКТ- клеток – 11%, соответствующее оптимальному соотношению чувствительности и специфичности в определении вероятности умереть (Рисунок 2).

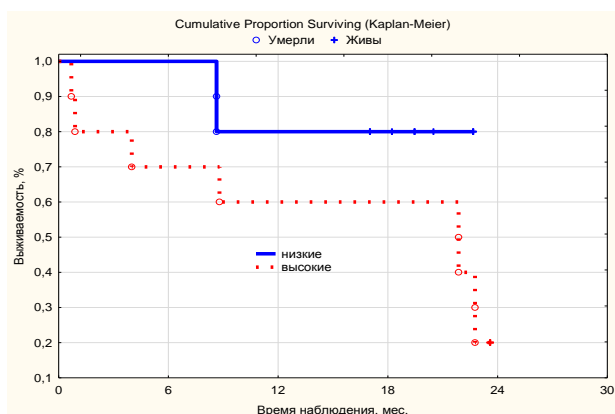


Рисунок 2 – ОВ в зависимости от уровня НКТ- клеток (CD3+CD16+CD56+TILs) у больных раком желудка II группы

В то же время обнаружено, что увеличение степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами CD45+CD14-TILs (HR=1,005; 95%ДИ 1,002-1,008, p=0,003) и увеличение возраста пациентов (HR=1,098; 95%ДИ 1,031-1,170, p=0,004) оказывают отрицательное влияние на ВВП у больных мРЖ.

Исследование TILs методом иммуногистохимии у больных РЖ

Методом иммуногистохимии исследовались интратуморальные (iTILs) и стромальные (sTILs) субпопуляции лимфоцитов CD4+TILs; CD8+TILs, а также их соотношение CD4+/CD8+TILs.

При проведении подгруппового анализа выявлено, что число CD4+sTILs, CD8+sTILs, CD4+/CD8+sTILs статистически значимо выше в I группе по сравнению со II. Следует отметить, что у пациентов II группы субпопуляции sTILs не встречались (21,9 против 0, p=0,003; 38,0 против 0, p=0,004; CD4+/CD8+ (p=0,001) соответственно). Кроме этого, при прогрессировании заболевания у больных I группы отмечалось статистически значимое увеличение соотношения стромальных CD4+ TILs к CD8+ TILs (0,20 кл/п.з. против 0,51 кл/п.з., p=0,035). При анализе конкордантности двух методов исследования по определению CD3+CD4+TILs и CD3+CD8+TILs методом проточной цитометрии и CD4+TILs, CD8+TILs методом иммуногистохимии у больных раком желудка найдена значимая отрицательная корреляция ($r_s=-0,138$;

$p=0,365$). При ОФА было показано, что $CD4+/CD8+iTILs$ является фактором неблагоприятного исхода для выживаемости без прогрессирования у больных ранним и местно-распространенным РЖ ($HR=3,264$; 95% ДИ1,09-9,78, $p=0,035$).

Динамика показателей системного и локального иммунитета до и в процессе лечения у больных РЖ

У 20 пациентов химиотерапевтической группы, представленных метастатическим РЖ, был выполнен двукратный анализ показателей клеточного состава периферической крови и опухолевой ткани. У 15 больных исследование проведено в динамике - до начала лечения и после 3-4 курсов ХТ (во время первого контрольного обследования).

Динамика показателей иммунофенотипа лимфоцитов ПК в процессе лечения у больных РЖ

При изучении «линейной» структуры, субпопуляций Т-клеток и функциональной активности клеток-эффекторов, регуляторных минорных популяций лимфоцитов системного иммунитета периферической крови до и в процессе химиотерапии выявлено снижение перфоринового потенциала $CD16$ клеток и $CD16ЦТП$, составив 17,7% против 14,1%, ($p=0,031$) и 81,9% против 64,3%, ($p=0,009$) соответственно. Напротив, медианы $CD4$ и $CD8$ Т-регуляторных клеток статистически значимо увеличивались в процессе химиотерапии составив 6,2% против 47,0%, ($p=0,007$); 12,1% против 18,4%, ($p=0,031$) соответственно. Для оценки возможности предсказания раннего прогрессирования у пациентов II группы мы сравнили результаты исследования системного иммунитета в подгруппах, где прогрессирование заболевания зарегистрировано в сроки до 6 месяцев и позднее. Выявлено, что высокий уровень $CD8$ Т-регуляторных клеток до начала лечения является прогностическим фактором благоприятного прогноза составив 12,1($n=15$) против 5,1($n=5$), ($p=0,019$).

Характер изменения показателей в процессе химиотерапии также может быть информативен для предсказания раннего прогрессирования, поэтому мы сравнили величину данного изменения в зависимости от сроков прогрессирования. В связи с тем, что у пациентов, обследованных в динамике, раннее прогрессирование (до 6 месяцев) не было зафиксировано, дальнейшая граница анализа срока

прогрессирования составила 9 месяцев. Было обнаружено, что увеличение уровня эффекторных CD16-клеток в процессе химиотерапии ассоциировано с улучшением выживаемости без прогрессирования составив 9,1 (n=8) против 69,5 (n=7), (p=0,013).

Динамика показателей иммунофенотипа TILs в процессе лечения у больных РЖ

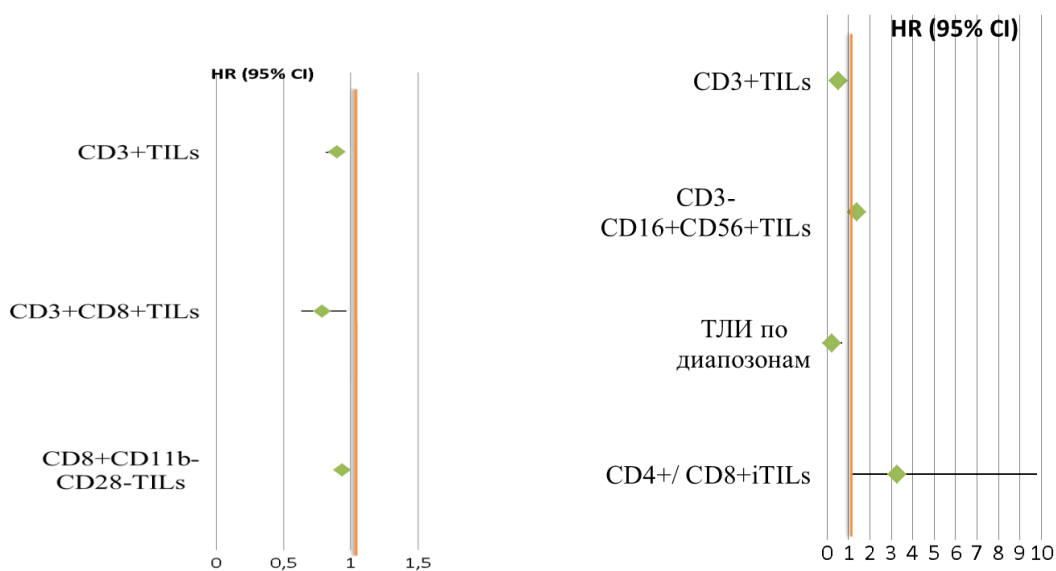
При изучении «линейной» структуры, субпопуляций Т-клеток и функциональной активности клеток-эффекторов, регуляторных минорных популяций лимфоцитов локального иммунитета до и в процессе химиотерапии выявлено, что процентное содержание цитотоксического потенциала CD16+TILs и CD3+CD8+TILs клеток статистически значимом повышается в процессе химиотерапии у больных мРЖ, составив 3,1% - 5,4%, (p=0,009) и 55,7%-64,7%, (p=0,012) соответственно. Оказалось, что низкий уровень эффекторных CD16+Perforin+ клеток и их цитотоксического потенциала до начала химиотерапии являются неблагоприятным фактором и могут свидетельствовать о более высоком риске прогрессирования до 6 месяцев составив 0,5 (n=5) против 4,6 (n=15), (p=0,030) и 13,2 (n=5) против 55,7 (n=15), (p=0,011) соответственно. При анализе изменений показателей в динамике обнаружено, что у больных мРЖ с прогрессированием до 9 месяцев отмечалось статистически значимое увеличение Т-клеток, НКТ-клеток и CD4+Т-регуляторных клеток по сравнению с более поздним прогрессированием (22,0 против 9,7, (p=0,012); 207,9 против 13,8, (p=0,002) и 190,7 против 25,2, (p=0,002) соответственно). Напротив, повышение CD16ЦТПТILs являлось благоприятным прогностическим фактором в отношении ВБП (18,1 против 7,5, (p=0,031)).

Комплексная оценка иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови, факторов воспаления, иммунофенотипа TILs и клинических показателей на показатели выживаемости у больных РЖ

Так как лечение и отдаленные результаты в I и II группе заведомо разные, мы провели анализ прогностических факторов отдельно для каждой группы. В анализ включены все значимые показатели иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови, факторов воспаления, иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, определенных методом проточной цитометрии и иммуногистохимии в

соответствии с клиническими данными (возраст пациента (как по годам, так и по группам: до 45 лет, 46-60 лет, старше 60 лет), стадия заболевания, степень дифференции (G), индекс массы тела, тип по Lauren и статус MSI), полученные по результатам однофакторного анализа.

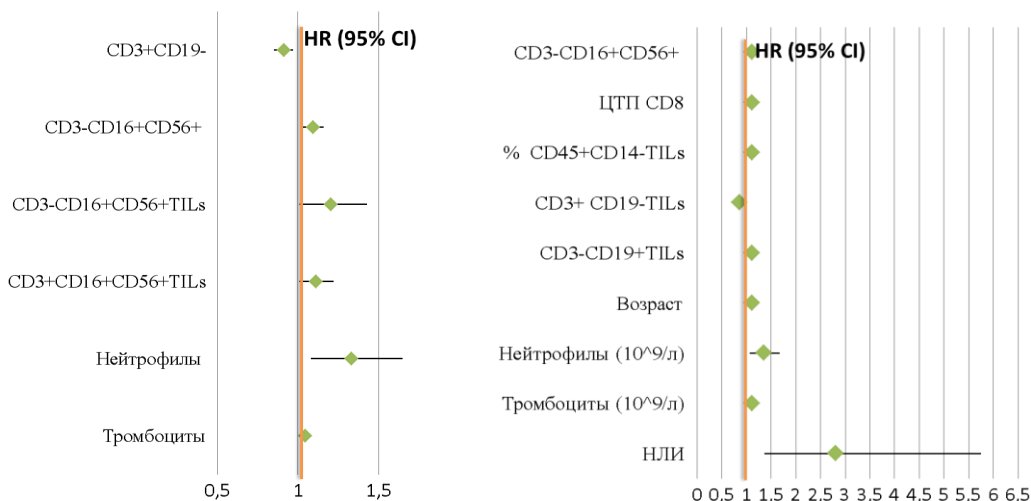
Данные однофакторного регрессионного анализа для ОБ и ВБП для I и II групп представлены на рисунках 4 и 5.



Общая выживаемость

Выживаемость без прогрессирования

Рисунок 4 – Величина рисков, влияющих на ОБ и ВБП пациентов I группы



Общая выживаемость

Выживаемость без прогрессирования

Рисунок 5 – Величина рисков, влияющих на ОБ и ВБП пациентов II группы

Выполнение многофакторного регрессионного анализа по Коксу для ОБ пациентов I группы не позволило построить значимую математическую модель с

независимыми факторами. Однако для ВБП выявлено, что увеличение процентного содержания Т-клеток с фенотипом CD3+CD19-TILs является благоприятным фактором прогноза у больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ (HR=0,865; 95%ДИ0,782-0,957, p=0,005), а увеличение уровня НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs), напротив негативно влияет на показатель выживаемости без прогрессирования (HR=1,382; 95% ДИ 1,087-1,758, p=0,008).

Во II группе МФА выявил, что увеличение уровня нейтрофилов в периферической крови (HR=1,64; 95% ДИ 1,12-2,40, p=0,011), а также увеличение инфильтрации опухолевой ткани НК-клетками (HR=1,42; 95% ДИ 1,06-1,89, p=0,017) являются факторами неблагоприятного прогноза для ОВ у больных с мРЖ. В отношении ВБП во II группе независимо значимыми негативными факторами явились возраст, уровень нейтрофилов и тромбоцитов, составив HR=1,106; 95%ДИ 1,020-1,99, p=0,015; HR=1,714; 95% ДИ 1,063-2,764, p=0,027; HR=1,017; 95% ДИ 1,006-1,029, p=0,003 соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены различия показателей системного иммунитета у больных с ранними, местно-распространенными (I группа) и метастатическими формами (II группа) рака желудка. В периферической крови больных ранней и местно-распространенной низкодифференцированной аденокарциномой диффузного типа отмечено уменьшение цитотоксического потенциала CD16-клеток по сравнению с больными мРЖ.

2. Содержание «линейных» популяций, субпопуляций Т-клеток и функциональной активности клеток-эффекторов, регуляторных популяций лимфоцитов периферической крови и TILs у больных обеих групп отличались. Так, в опухолевой ткани больных мРЖ отмечено увеличение НК (6,9% против 3,2%, p=0,019) и НКТ-клеток (11,2% против 5,1%, p=0,0002), в периферической крови больных с ранним и местно-распространенным раком желудка – В-клеток (1,6% против 1,0%, p=0,017).

3. С увеличением стадии заболевания (I,II - III - IV) уменьшалось общее содержание %TILs (12,10% – 1,90% – 3,40%) в опухолевой ткани и увеличивался

перфориновый потенциал CD16+ клеток, как в крови (10,4% – 12,5% – 19,1%), так и в ткани (0,50% – 0,65% – 4,25%). Выявлен разнонаправленный характер изменения НКТ-клеток: с увеличением их содержания в опухолевой ткани отмечено снижение в периферической крови (25,1% – 10,7% – 11,1%) у больных с ранними, местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка.

4. В зависимости от прогрессирования заболевания определены нарушения в «линейной» структуре лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, где у больных с ранними, местно-распространенными формами рака желудка с прогрессированием отмечено статистически значимое снижение CD3+CD19-TILs (72,70% против 86,25%, $p=0,008$) и увеличение CD3-CD16+CD56+TILs (3,80% против 2,80%, $p=0,033$).

5. Найдены закономерности показателей системного и локального иммунитета у больных раком желудка, влияющие на продолжительность жизни. Для ранних и местно-распространенных форм рака желудка ими были низкий уровень CD3+CD8+TILs (16,40% против 32,35%, $p=0,010$) и CD8+CD11b-CD28-TILs (25,40% против 54,70%, $p=0,013$). При мРЖ - более низкий уровень CD3+CD19- Т-клеток (65,55% против 78,60%, $p=0,044$) в периферической крови и повышенное содержания CD3+CD16+CD56+TILs (13,80% против 7,65%, $p=0,072$) в опухолевой ткани.

6. Методом иммуногистохимии определены факторы благоприятного прогноза в виде стромальных субпопуляций лимфоцитов TILs (CD4+sTILs, CD8+sTILs, CD4+/CD8+sTILs) у больных с ранними, местно-распространенными стадиями заболевания и неблагоприятного прогноза в виде интратуморальных субпопуляций лимфоцитов TILs (CD3+CD4+iTILs, CD3+CD8+iTILs) у больных с метастатическим раком желудка.

7. В процессе химиотерапии выявлено статистически значимое повышение цитотоксического потенциала CD16+TILs (55,7 против 64,7, $p=0,012$) и CD3+CD8+TILs (3,1 против 5,4, $p=0,009$), где увеличение первых (-7,5 против 18,1, $p=0,031$) и, напротив, снижение Т-клеток (22,0 против -9,7, $p=0,012$), НКТ-клеток (207,9 против -13,8, $p=0,002$) и CD4 Т-регуляторных клеток (190,7 против -25,2, $p=0,002$) в опухолевой ткани и эффекторных CD16-клеток (-69,5% против 9,1%,

$p=0,013$) в периферической крови ассоциировалось с увеличением ВБП (более 9 месяцев).

8. Увеличение уровня CD3-CD16+CD56+TILs ассоциировалось с ухудшением выживаемости без прогрессирования у больных с ранними, местно-распространенными формами рака желудка и общей выживаемости у больных с метастатическим раком желудка (HR=1,382; 95% ДИ 1,087-1,758, $p=0,08$).

Для больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ благоприятным фактором прогноза для ВБП было увеличение содержания CD3+CD19-TILs (HR=0,865; 95% ДИ 0,782-0,957, $p=0,05$), а фактором неблагоприятного исхода – увеличение соотношения CD4+/CD8+iTILs (HR=3,264; 95% ДИ 1,09-9,78, $p=0,035$).

Для больных мРЖ факторами неблагоприятного прогноза для ОВ являлись увеличение уровня нейтрофилов в периферической крови (HR=1,64; 95% ДИ 1,12-2,40, $p=0,011$), а также увеличение инфильтрации опухолевой ткани НК-клетками (CD3-CD16+CD56+TILs) (HR=1,42; 95% ДИ 1,06-1,89, $p=0,017$). Для ВБП больных мРЖ статистически значимо значимыми явились возраст, уровень нейтрофилов и тромбоцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хакимова, Г.Г. Анализ системного иммунитета и воспаления в прогнозе аденокарциномы желудка/ Г.Г. Хакимова, Т.Н. Заботина, А.А. Трякин, А.А. Борунова, Т.В. Давыдова, А.Е. Калинин, Ю.В. Вахабова, Е.Н. Захарова, Д.В. Табаков //Успехи молекулярной онкологии. – 2020. – Т.7. – №1. – С.38-46.

2. Хакимова, Г.Г. Влияние локального иммунитета на прогноз рака желудка/ Г.Г. Хакимова, А.А. Трякин, Т.Н. Заботина, А.А. Борунова, О.А. Малихова, Ф.М. Джураев, И.Н. Перегородиев, Е.Н. Захарова, Д.В. Табаков // Современная онкология. – 2020. – Т.22. – №1. – С.36-41.