

В.Л. Валецький

Інститут онкології
АМН України, Київ, Україна

Ключові слова: рак шлунка, поширеність пухлини (TNM), субпопуляції лімфоцитів, ІЛ-2-рецептори, нейтрофільні гранулоцити, периферична кров.

СТАН КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА ЗАЛЕЖНО ВІД ПОШИРЕНОСТІ ПУХЛИНИ

Резюме. Встановлено, що для хворих на рак шлунка характерними є зниження вмісту лімфоцитів, CD8-клітин, натуральних кілерів, підвищення співвідношення CD4/CD8, низька експресія рецептора ІЛ-2 на лімфоцитах, зниження фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів у крові. Характер та глибина імунних порушень не залежать суттєво від ступеня інвазії пухлиною стінки шлунка та сусідніх органів. За наявності метастазів у регіонарних лімфовузлах і віддалених метастазів спостерігається більш виражений дефіцит натуральних кілерів. Найбільш виражені порушення імунологічних показників виявлені у хворих з віддаленими метастазами.

ВСТУП

Не викликає сумніву факт, що розвиток пухлинного процесу супроводжується порушеннями імунної системи. Проте все ще остаточно не вирішене питання про первинність імунних порушень у розвитку пухлини — імунологічні вади створюють умови для розвитку раку чи розвитку пухлинного процесу зумовлює дефекти в імунній системі. Ймовірно, між цими явищами існує причинно-наслідковий зв'язок. Аналіз даних літератури свідчить, що не існує єдиної точки зору і щодо характеру імунних порушень, які супроводжують розвиток раку шлунка (РШ). При визначенні субпопуляцій лімфоцитів у периферичній крові (ПК) встановлено, що відсоток CD8+11b+ лімфоцитів при поширених стадіях РШ був зниженим. Відсоток цитотоксичних лімфоцитів при цьому суттєво не змінювався, однак мала місце тенденція до збільшення їх кількості при РШ IV стадії [1]. В дослідженні [2] було встановлено, що вміст CD3+, CD4+ та CD8+ лімфоцитів може бути важливим критерієм прогнозу у хворих на РШ. Показники у хворих, які прожили більше 5 років, меншою мірою відрізнялися від фізіологічної норми порівняно з показниками у пацієнтів, які померли внаслідок метастазів та рецидивів захворювання [2]. В іншому дослідженні виявлено, що абсолютна кількість лімфоцитів, Т- і В-лімфоцитів та Т-хелперів/індукторів (Тх/Ті) у хворих на РШ була вірогідно зменшена, а кількість Т-супресорів/цитотоксиків (Тс/Тц) та натуральних кілерів (НК) суттєво не змінювалася. Автори вважають, що дисбаланс у співвідношенні субпопуляцій Т-клітин може бути обумовлений з прогресуванням РШ після лікування [3]. Подібні результати одержано при обстеженні хворих на РШ III–IV стадії: суттєве зниження співвідношення CD4/CD8 корелювало зі ступенем пухлинної інвазії, кількістю метастазів у лімфовузлах, розмірами пухлини [4]. В інших дослідженнях отримані протилежні дані — зниження відсотка CD8 (лімфоцитів) при поширених стадіях РШ [5], а також підвищення

співвідношення CD4/CD8 у хворих на рак травного тракту [6].

Вважають, що порушення перелічених вище імунологічних показників в першу чергу залежить від стадії захворювання, гістологічної будови пухлини і меншою мірою — від форми росту та локалізації пухлини в шлунку [7]. Питання про кількісні зміни популяції НК залишається відкритим.

Отже, дані літератури не дають чіткого уявлення про те, які саме ланки системи імунітету є найбільш ураженими в динаміці захворювання на РШ. Тому завданням нашого дослідження було визначення відносного вмісту субпопуляцій лімфоцитів (включаючи НК та лімфоцити, що експресують під дією мітогену рецептор ІЛ-2) та фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів (НГ) у хворих на РШ до лікування залежно від поширеності пухлини (Т), наявності або відсутності метастазів у регіонарних лімфовузлах (N) та віддалених метастазів (M).

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом дослідження була ПК 103 хворих на РШ, яких обстежували до початку лікування. Як контроль досліджували кров 33 здорових осіб. У хворих на РШ і у донорів досліджували та аналізували такі імунологічні показники: відносний вміст лімфоцитів, Т-лімфоцитів (CD3), В-лімфоцитів (CD19), НК (CD16/56), Тх/Ті (CD4), Тс/Тц (CD8), лімфоцитів, що експресують рецептор ІЛ-2 (CD25), фагоцитарну активність НГ.

Визначення субпопуляцій лімфоцитів проводили за методом двокольорової проточної цитофлуориметрії з використанням відповідної панелі моноклональних антитіл, як описано раніше [8]. Для вивчення експресії на лімфоцитах рецептора ІЛ-2 (CD25) клітини з ПК інкубували продовж 12–18 год при температурі 37 °C у середовищі RPMI 1640 («Flow Laboratories», Великобританія) в присутності фітогемаглютиніну («Difco», США) у кінцевій кон-

центрації 1 мкг/мл. По закінченні інкубації клітини двічі відмивали фосфатним буфером, ресуспендували у 200 мкл буфера та інкубували з моноклональними антитілами Anti-IL2 R FITS («Becton Dickinson», США). Аналіз зразків проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі «FACScan» («Becton Dickinson», США) в режимі FACSCAN однокольорова цитометрія — з процедурою накладання вікна дискримінації. У кожній пробі аналізували не менше ніж 1000 клітин. Відсоток фагоцитуючих НГ визначали, як описано в публікаціях [8].

Для оцінки вірогідності різниці між групами використовували критерій Стьюдента t_d , непараметричні показники обчислювали та порівнювали за методом аналізу варіацій (ANOVA). Результати обробляли за допомогою методів математичної статистики на персональному комп'ютері в програмі SPSS, 1999 («SPSS Inc», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що у хворих на РШ визначають відмінності у відносному вмісті субпопуляцій лімфоцитів у ПК порівняно з показниками у донорів (табл. 1). Зокрема, відсоток лімфоцитів у хворих на РШ був вірогідно знижений; виявлена відносна нестача CD8-, CD16/56- та CD25-лімфоцитів, а також зниження відсотка фагоцитуючих НГ. Не знайдено суттєвих відхилень у відносному вмісті субпопуляцій CD3-, CD19- та CD4-лімфоцитів. Відповідно до зменшення кількості CD8 при збереженні нормального вмісту CD4 у хворих на РШ спостерігалось підвищення співвідношення CD4/CD8 (див. табл. 1).

За результатами аналізу імунологічних показників у хворих на РШ залежно від поширеності пухлини (табл. 2) встановлено, що як і в загальній групі хворих на РШ, у хворих з проростанням пухлиною всіх шарів шлунка (Т3) або з ураженням пухлиною сусідніх органів (Т4) виявлена нестача НК (CD15/56) та CD8-лімфоцитів, підвищене співвідношення CD4/CD8, знижена активність НГ та експресія рецептора ІЛ-2 (CD25). Згідно з даними табл. 2, вираженість змін не залежить від показника Т. Аналіз залежності від наявності або відсутності метастазів у регіонарних лімфоузлах (див. табл. 2) показав: кількість CD16/56-лімфоцитів у хворих з показником N1–2 не відрізнялася суттєво від такої у хворих

на РШ з показником N0. Однак порівняно з донорами зниження вмісту НК у хворих з метастазами в регіонарних лімфоузлах було більш значущим. Інші імунні зміни, характерні для хворих на РШ (нестача CD8, підвищення співвідношення CD4/CD8, зниження відсотка фагоцитуючих НГ та вмісту CD25-лімфоцитів), не залежали від наявності або відсутності метастазів в регіонарних лімфоузлах. У хворих без віддалених метастазів (M0) імунні зміни практично повторювали такі у загальній групі хворих на РШ, в той час як у хворих з віддаленими метастазами (M1) виявляли інші імунологічні характеристики (див. табл. 2). Так, для хворих зі стадією M1, так само як і для хворих з N1–2, зниження вмісту НК було більш значущим. Слід також відзначити, що хворі на РШ з M1 були єдиною групою, в якій не відзначали зменшення кількості CD25-лімфоцитів, але спостерігали нестачу Т-лімфоцитів (CD3) та підвищення вмісту В-лімфоцитів (CD19).

Одержані нами результати дещо відрізняються від таких у дослідженнях [3, 4], проведених раніше також з використанням моноклональних антитіл та застосуванням методу проточної цитометрії. Зокрема, автори дослідження [3] також виявляли у хворих на РШ зменшення абсолютної кількості лімфоцитів, однак, на відміну від наших результатів, кількість Т- і В-лімфоцитів та Тх/Ті була вірогідно зменшена, а кількість Тс/Тц та НК — суттєво не змінювалась. У дослідженні [4] у хворих на РШ було встановлено суттєве зниження співвідношення CD4/CD8, що суперечить нашим даним про підвищення цього показника. Розбіжність отриманих нами та іншими авторами даних можна пояснити особливістю аналізу, який використовується для двокольорової цитометрії, оскільки він дає змогу оцінити 90–100% лімфоцитів (при цьому не відбувається «загублення» клітин, яке може привести до артефактних даних про їх низький вміст), а також виявити фенотип лімфоцитів з максимальною точністю (тобто виключити помилковий результат відносно їх високого вмісту). В жодному з наведених нами досліджень цей метод аналізу не використовувався.

Дані, які підтверджують наші результати (зниження відсотка CD8 при поширених стадіях РШ та підвищення співвідношення CD4/CD8), наведені в публікаціях [5, 6].

В оцінці протипухлинного імунітету особливе значення мають ефекторні клітини, що виконують цитотоксичну функцію і здатні знищувати пухлинні клітини [9]. Це цитотоксичні Т-лімфоцити (CD8) та НК (CD16/56). Наші результати свідчать про зменшення кількості обох цих субпопуляцій лімфоцитів в ПК хворих на РШ, що узгоджується з результатами інших авторів про зниження функціональної активності цих клітин. Зокрема, у хворих на РШ встановлено зниження природної цитотоксичності цільної крові порівняно з донорами [10], різке зниження рівня індукції алогенної цитотоксичності та продукції ІЛ-2 порівняно з пацієнтами із доброякі-

Таблиця 1
Відносний вміст лімфоцитарних субпопуляцій та фагоцитарна активність у крові хворих на РШ (загальна група)

Показник	Хворі на РШ (n = 103)	Здорові донори (n = 33)
Лімфоцити, %	23,5 ± 1,7 *	29,9 ± 3,8
CD3, %	65,3 ± 5,0	71,5 ± 4,2
CD19, %	15,2 ± 2,8	13,8 ± 2,8
CD16+56, %	10,1 ± 1,7 **	14,3 ± 2,3
CD4, %	44,6 ± 5,3	41,5 ± 3,8
CD8, %	25,7 ± 3,8 **	35,6 ± 3,1
CD4/CD8	1,9 ± 0,08 *	1,2 ± 0,06
CD25, %	16,3 ± 3,5 *	21,7 ± 3,1
Фагоцитуючі НГ, %	76,2 ± 5,8 *	92,7 ± 7,1

*p < 0,05 порівняно з показниками групи здорових донорів;

**p < 0,02 порівняно з показниками групи здорових донорів.

Відносний вміст лімфоцитарних субпопуляцій та фагоцитарна активність у крові хворих на РШ залежно від показників TNM

Показник	Хворі на РШ					
	T3	T4	N0	N1-2	M0	M1
CD3, %	64,34±5,2	66,9±4,7	65,5±4,9	65,1±5,6	65,9±4,4	62,3±3,6*
CD19, %	14,9±2,5	15,8±3,2	14,8±2,5	15,7±3,1	14,8±2,2	17,5±2,9*
CD16+56, %	10,6±4,0	8,9±3,7*	10,6±3,2*	9,5±2,6**	10,1±2,6*	9,8±1,7**
CD4, %	44,3±5,3	45,1±5,4	45,3±5,6	43,6±5,9	44,2±4,9	46,7±4,3
CD8, %	26,3±4,7*	25,4±2,7*	25,3±3,7*	27,2±3,7*	25,8±3,9*	27,6±2,9*
CD4/CD8	1,9±0,1*	1,9±0,1*	2,0±0,1*	1,7±0,1*	1,9±0,03*	1,8±0,08*
CD25, %	16,6±3,7*	15,7±3,8*	15,7±3,7*	17,1±3,9*	15,8±3,3*	19,2±2,6
Фагоцитуючі НГ, %	76,2±6,8**	79,6±4,4**	78,0±6,2*	77,2±5,4**	78,0±6,2**	75,6±5,4**

* $p < 0,05$ порівняно з показниками групи здорових донорів; ** $p < 0,02$ порівняно з показниками групи здорових донорів.

сними захворюваннями [11], зменшення природної цитотоксичності та продукції інтерферону [12]. Характерною імунологічною ознакою хворих на РШ, за нашими даними, є значне зниження функціональної (фагоцитарної) активності НГ, ступінь вираженості якої не залежав від критеріїв TNM.

Отже, виявлено, що у хворих на РШ відзначають однотипні зміни незалежно від ступеня поширеності первинної пухлини. За наявності метастазів в регіонарних лімфовузлах та віддалених метастазів спостерігається більш суттєвий дефіцит НК. Найбільш «імунологічно скомпрометованою» слід вважати групу пацієнтів з віддаленими метастазами, у яких спостерігалися більш виражена нестача кількості НК, фагоцитарної функції, Т-лімфопенія, підвищення вмісту В-лімфоцитів.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що, вірогідно, від дефіциту цитотоксичних лімфоцитів залежить ступінь інвазії пухлиною стінки шлунка та сусідніх органів, в той час як утворення метастазів в регіонарних лімфовузлах та віддалених метастазів, скоріше, обумовлено нестачею НК. Дефіцит цих клітин є, на нашу думку, найбільш несприятливим прогностичним імунологічним фактором для хворих на РШ. В цілому, між ступенем поширеності пухлинного процесу при РШ та характером і глибиною імунних порушень існує причинно-наслідковий зв'язок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Tanabe H, Imai N, Watanabe S, *et al.* Изучение двухцветной цитометрией субпопуляций лимфоцитов у больных раком желудка. *Jap Cancer Clin* 1991; **37** (8): 821–4.
2. Ohwada S. Субпопуляції Т-кліток в периферической крові в предсказании прогноза при раке желудка. Мультивариантный регрессионный анализ сох пороговой моделью. *J Jap Soc Cancer Ther* 1991; **26** (10): 2262–70.
3. Katoh Y, Ishida M, Hiraishi H, *et al.* Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with gastric cancer. *Dokkyo J Med Sci* 1993; **20** (2): 129–37.
4. Lee W-J, Chang KJ, Lee Ch-Sh, *et al.* Selective depression of T-lympjocyte subsets in gastric cancer patients: An implication of immunotherapy. *J Surg Oncol* 1994; **55** (3): 165–9.
5. Wu T, Wang L. Dinamical study of changes in prostaglandin E2 and cell immunity functions in gastric cancer patients. *Clin J Bases and Clin in Gen Surg* 1998; **5** (1): 24–5.

6. Ran J, Zhang J, Guo Q. Effect of intraperitoneal hyperthermochemotherapy on T-lymphocyte subsets and sIL-2R level in patients with gastrointestinal carcinoma. *Clin J Bases and Clin in Gen Surg* 1999; **6** (3): 156–7.

7. Зырянов БН, Васильев НВ, Смольянинов ЕС и др. Система иммунитета и факторы естественной резистентности у больных раком желудка. *Вопр онкол* 1987; **33** (11): 23–9.

8. Валецький ВЛ, Чорний ВО. Вплив інтраопераційної внутрішньочеревної хіміотерапії з застосуванням іммобілізованих цитостатиків на імунологічні показники хворих на рак шлунка. *Онкол* 2001; **3** (2–3): 155–9.

9. Zielinski Ch, Muller Ch. Die naturlische zellulare immunitat als effectormechanismus der tumorabwehr. *Acta Med Austr* 1987; **14** (2): 34–6.

10. Балашов КЕ, Летягин ВП, Ожерельев АС и др. Естественная противоопухолевая цитотоксичность цельной крови доноров и онкологических больных. *Вопр онкол* 1987; **33** (12): 71–4.

11. Akiyoshi T, Koba F, Arigana Sh, *et al.* Preoperative cell-mediated immune function and the prognosis of patients with gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 1990; **45** (3): 137–42.

12. Цой ИГ, Булегенова МГ, Джумагулова АБ и др. Интерферонпродуцирующая способность и естественная цитотоксическая активность лимфоцитов местного и системного иммунитета при язвенной болезни и раке желудка. *Иммунол* 1997; (6): 40–3.

CELL IMMUNITY IN PATIENTS WITH CANCER OF THE STOMACH AS A FUNCTION OF TUMOR EXTENSION

V.L. Valetsky

Summary. Gastric cancer patients had low levels of lymphocytes, CD8 cells, natural killers, high CD4/CD8 ratio, low expression of IL-2 receptors on lymphocytes and low activity of phagocytosing neutrophiles in comparison with healthy persons. Tumor invasion of stomach wall and adjacent organs did not significant influence on immunological changes. Metastasis to regional lymph nodes and distant metastases were associated with more significant decrease of natural killer level. The most expressive disorders in cell immunity were found in the gastric cancer patients with distant metastases.

Key Words: cancer of the stomach, tumor extension (TNM), lymphocyte subsets, IL-2 receptors, neutrophilic granulocytes, peripheral blood.