

АКТИВАЦИЯ CD4⁺CD39⁺ Т-КЛЕТОК ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Г. А. Жулай¹✉, А. В. Чуров¹, Е. К. Олейник¹, А. А. Романов², П. Н. Семакова¹, В. М. Олейник¹

¹ Институт биологии, Карельский научный центр Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН), Петрозаводск

² Республиканский онкологический диспансер, Петрозаводск

Патогенез колоректального рака (КРР) сопровождается значительными изменениями в состоянии иммунной системы. Однако роль аденозин-A2AR-опосредованного иммуносупрессорного механизма и в частности экспрессии молекулы энтонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазы-1 (ENTPD1), или CD39, в его развитии до конца не изучена. Целью работы было исследование роли CD4⁺ Т-клеток, прежде всего экспрессирующих CD39 регуляторных Т-лимфоцитов (T_{reg}), в формировании иммунной супрессии при КРР, а также у больных острым панкреатитом (ОП). Экспрессию молекул лимфоцитами крови и опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (ОИЛ) анализировали методом проточной цитометрии. Содержание матричной РНК (мРНК) *CD39* в лейкоцитах периферической крови определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. В результате исследования показано, что у больных КРР накопление периферических CD4⁺CD39⁺ клеток происходит на поздних стадиях развития опухоли. Среди ОИЛ количество CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих молекулу CD39, выше, чем в крови тех же больных. Значительно повышен уровень экспрессии этой молекулы у регуляторных Т-клеток (T_{reg}) больных КРР как на периферии, так и среди ОИЛ. Установлены достоверные связи между содержанием CD4⁺CD39⁺ Т-клеток и показателями клеточного иммунитета больных КРР. Обнаружено, что уровень мРНК гена *CD39* также увеличивался в процессе развития КРР. У больных ОП, напротив, содержание мРНК гена *CD39* оставалось на уровне контроля, так же как и количество CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в периферической крови. Таким образом, можно заключить, что активация CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в процессе канцерогенеза играет важную роль и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: колоректальный рак, энтонуклеотидаза CD39, T_{reg}-клетки, транскрипционный фактор FOXP3

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания КарНЦ РАН, тема № 0221-2017-0043.

✉ **Для корреспонденции:** Галина Анатольевна Жулай
ул. Пушкинская, д. 11, г. Петрозаводск, 185014; zhgali-111@yandex.ru

Статья получена: 25.01.2018 **Статья принята к печати:** 20.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.027

ACTIVATION OF CD4⁺CD39⁺ T CELLS IN COLORECTAL CANCER

Zhulai GA¹✉, Churov AV¹, Oleinik EK¹, Romanov AA², Semakova PN¹, Oleinik VM¹

¹ Institute of Biology, Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS), Petrozavodsk

² Republic Oncology Center, Petrozavodsk

Pathogenesis of colorectal cancer (CRC) is accompanied by significant changes in the immune system. However, the role of the adenosine-A2AR-mediated immunosuppressive pathway in oncogenesis and more specifically, the expression of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (ENTPD1, also known as CD39) remains unclear. The aim of this work was to study the role of CD4⁺ T cells, most importantly CD39-expressing regulatory T cells (Tregs) in the formation of immune suppression in CRC and in patients with acute pancreatitis (AP). Expression of CD39 by peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) was measured by flow cytometry. The levels of *CD39* messenger RNA (mRNA) in the peripheral blood leukocytes were determined by real-time PCR. Our study reveals that patients with CRC accumulate peripheral CD4⁺CD39⁺ cells in the advanced stages of the disease. The proportion of CD39-expressing CD4⁺ T cells in the total pool of TILs was higher than in the peripheral blood of the same patients. Tregs of both peripheral blood and tumor specimens of CRC patients showed increased CD39 expression. We have found reliable correlations between the levels of CD4⁺CD39⁺ T cells and the parameters of cell-mediated immunity in CRC patients. Also, *CD39* mRNA levels gradually increased during CRC progression. In contrast, patients with AP have the same levels of *CD39* mRNA and peripheral blood CD4⁺CD39⁺ T cells as the controls. Finally, we conclude that activation of CD4⁺CD39⁺ T cells has an important role in oncogenesis and needs to be studied further.

Keywords: colorectal cancer, ectonucleotidase CD39, Treg cells, transcription factor FOXP3

Funding: the study was part of the State assignment for the Federal Research Center Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (Project 0221-2017-0043).

✉ **Correspondence should be addressed:** Galina A. Zhulai
Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, Republic of Karelia, 185014; zhgali-111@yandex.ru

Received: 25.01.2018 **Accepted:** 20.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.027

Колоректальный рак (КРР) — одна из ведущих форм злокачественных новообразований среди онкологических заболеваний и причин смертности в России [1] и в мире [2, 3]. Число больных с первичным КРР постоянно растет, причем заболеваемость гораздо выше в индустриально развитых странах Европы и Северной Америки, чем в развивающихся странах Африки, Азии и Южной Америки [2]. Развитие КРР тесно связано с механизмами регуляции

иммунного ответа и сопровождается инфильтрацией опухоли иммунокомпетентными клетками [3–5]. Активно обсуждается роль хронического воспаления как фактора, способствующего развитию КРР, так как у больных с воспалительными заболеваниями кишечника увеличен риск возникновения КРР. По некоторым данным, противовоспалительная терапия снижает вероятность развития опухолей желудочно-кишечного тракта [7, 8].

В настоящее время в онкоиммунологии уделяется значительное внимание изучению эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазы-1 (ENTPD1, CD39). Молекула CD39 совместно с CD73 (экто-5'-нуклеотидаза, NT5E) участвует в генерации внеклеточного аденозина. Образование внеклеточных пуриновых нуклеозидов играет фундаментальную роль в регуляции воспаления и тканевого гомеостаза. В иммунокомпетентных клетках аденозин передает сигнал преимущественно через рецептор A2A (A2AR), один из четырех аденозиновых рецепторов, связанных с G-белком. Стимуляция A2AR лимфоцитов приводит к уменьшению секреции IL2 и пролиферативной активности нативных CD4⁺ T-клеток; снижению уровня IFN γ и IL4 у T-хелперов; увеличению экспрессии молекул CTLA-4, PD1 и CD40L [8]. Иммуносупрессорный механизм, включающий взаимодействие аденозина и A2AR, способен защищать нормальные ткани от повреждений при развитии воспалительных реакций. Однако этот сигнальный путь активируется и в опухолевой ткани, особенно в ответ на гипоксию, что обеспечивает защиту раковых клеток от распознавания иммунной системой и уничтожения [9]. Роль данного механизма в развитии опухолей была продемонстрирована на экспериментальных моделях A2AR^{-/-}-мышей, у которых наблюдалась регрессия иммуногенных опухолей [10], а также мышей с нокаутом генов CD39 или CD73, отличающихся опухоль-резистентными свойствами [11, 12].

Экспрессия CD73 в опухолевой ткани описана довольно хорошо. Известно, что данный маркер экспрессируют различные типы клеток: опухолевые клетки, эндотелиальные клетки, клетки стромы [13]. Меньше известно об экспрессии в опухолевом микроокружении мембранного маркера CD39. Предполагается, что один из основных источников этой молекулы в инфильтрате опухоли — регуляторные T-клетки (T_{reg}) [14]. Используя различные супрессорные механизмы, T_{reg}-клетки способны предотвращать развитие аутоиммунных реакций и поддерживать иммунологическую толерантность [15, 16]. Ключевым транскрипционным фактором этих клеток является FOXP3, который отвечает за их развитие и супрессорную функцию [17]. При канцерогенезе T_{reg}-клетки играют негативную роль, способствуя развитию опухоли. Показано, что они присутствуют в большом количестве в периферической крови онкологических больных и ткани различных форм опухолей [18].

На сегодняшний день KPP — один из наиболее распространенных типов злокачественных новообразований, однако роль аденозин-A2AR иммуносупрессорного механизма в его развитии до конца не изучена. Поэтому целью работы было исследование роли CD4⁺ T-клеток, экспрессирующих CD39, в формировании иммунной супрессии у больных KPP.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В работе обследовано 42 пациента с KPP, средний возраст которых составил 65 ± 12,4 лет. Критериями включения в исследование были: возраст 18–70 лет, наличие гистологически и цитологически подтвержденного диагноза «колоректальный рак». Критерии исключения: наличие других форм новообразований в анамнезе, а также иммуновоспалительных заболеваний. В качестве контроля анализировали лимфоциты 30 здоровых доноров в возрасте 54,4 ± 20,6 лет. Диагноз KPP устанавливался на основании клинических, лабораторных, эндоскопических и морфологических методов исследования. Было

диагностировано 6 человек с I стадией KPP (14,3%), 15 — с II (37%), 12 — с III (28,6%) и 9 больных с IV стадией (20%). Пациенты были разделены на две группы: в первую группу входили больные на I и II стадиях KPP, во вторую — на III и IV стадиях. Для проведения исследования было получено разрешение Комитета по медицинской этике при Министерстве здравоохранения и социального развития Республики Карелия и Петрозаводском государственном университете (протокол № 25 от 12.02.2013 г.). Проведен анализ фенотипов клеток периферической крови, а также опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), выделенных из клинических образцов опухолевой ткани ($n = 5$) больных с III стадией KPP.

Накопление аденозина в межклеточном пространстве происходит в ответ на метаболический стресс и разрушение клетки, т. е. при ишемии, гипоксии, воспалении и травме. В связи с этим интерес представляет исследование активации CD4⁺CD39⁺ клеток в условиях развития воспаления и иммунной супрессии, не связанной с канцерогенезом. В качестве такой группы сравнения были обследованы больные острым панкреатитом (ОП). В эту группу вошли 29 человек в возрасте 44,5 ± 18 лет. Диагноз был поставлен на основе классификации, принятой на IX Всероссийском съезде хирургов в 2000 г. Критериями включения в исследование были: возраст 18–70 лет, наличие диагноза «острый панкреатит». Критерии исключения: наличие в анамнезе других нозологий, прежде всего новообразований, а также аутоиммунных патологий. Анализ лимфоцитов у больных KPP и ОП проводили до начала терапии.

Процедуру выделения ОИЛ выполняли методом ферментативной дезагрегации. Свежевыделенную ткань измельчали, переносили в среду для ферментативной дезагрегации и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 2–3 ч при комнатной температуре. Среду готовили на основе RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% FBS (HyClone, США), 100 мг/мл гентамицина (Sigma, США) и 1 мг/мл коллагеназы IV (ПанЭко, Россия). Полученную суспензию пропускали через стерильные фильтры для клеток 70 и 40 мкм. Выделение фракции лимфоцитов проводили на раздельном градиенте фикола в 75% и 100%, который готовили из фикола плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко, Россия).

Экспрессию молекул клетками оценивали методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител CD4-FITC, CD8-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7 (Beckman Coulter, Франция), CD3-PE, CD16-FITC, CD19-FITC (Сорбент, Россия), FOXP3-PE (eBioscience, США), CD39 (R&DSystems, США) и соответствующих изотипических контролей. Анализ внутриклеточной экспрессии FOXP3 выполняли с применением набора буферов для фиксации и пермеабилзации (eBioscience, США). Экспрессию мРНК CD39 определяли методом ПЦР в реальном времени. Выделение и очистку нуклеиновых кислот проводили с помощью набора «AxyPrep Blood Total RNA Miniprep Kit» (Axygen, США). Для синтеза кДНК использовали случайные гексапраймеры и MMLV-обратную транскриптазу (Силекс, Россия). Амплификацию кДНК, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени выполняли с использованием реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Eurogen, Россия) на приборе «iCycler Thermal Cycler» (Bio-Rad, США). Анализ полученных данных проводили методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, где Ct — пороговый цикл, а ΔCt — разница между значениями пороговых циклов для референсного (*GAPDH*) и целевого

(CD39) генов. Итоговый уровень экспрессии исследуемого гена рассчитывали относительно контроля (здоровые доноры), принимая за единицу величину экспрессии исследуемого гена в контроле. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0», достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Данные представлены в виде $M \pm SD$. Исследование выполнено на научном оборудовании «Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ЦКП КарНЦ РАН).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе определяли содержание CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в периферической крови и среди ОИЛ у больных КРР. Обнаружено, что количество CD4⁺CD39⁺ Т-клеток на периферии как у здоровых, так и у больных лиц сильно варьирует. При КРР на поздних стадиях содержание CD4⁺CD39⁺ лимфоцитов было выше, чем в контроле ($p < 0,05$). В то же время у больных с I и II стадиями КРР значительных отличий в содержании CD4⁺CD39⁺ клеток не отмечено (рис. 1).

В опухолевой ткани среди лимфоцитов количество CD4⁺CD39⁺ Т-клеток было в 4 раза выше, чем в периферической крови тех же больных (рис. 2А).

Повышенное содержание CD4⁺CD39⁺ Т-клеток было отмечено и среди CD4⁺ Т-лимфоцитов (рис. 2Б). Также увеличенное количество CD39⁺ клеток среди ОИЛ наблюдалось в популяции Т-клеток, не несущих на своей

поверхности CD4 (рис. 2В). При этом в опухолевой ткани доля CD4⁺CD39⁺ клеток была больше, чем CD4⁺CD39⁻ ($p < 0,05$), чего не отмечено среди лимфоцитов, циркулирующих в крови.

Ранее мы исследовали у больных КРР популяционный состав периферических лимфоцитов (Т-клетки и их субпопуляции, В-клетки и NK-клетки, или естественные киллеры) [19]. Результаты цитометрического анализа представлены в табл. 1.

У больных КРР по сравнению с контролем снижено число В-лимфоцитов, как на начальных стадиях развития заболевания, так и на поздних ($p < 0,05$). Изменения количества CD3⁺ Т-лимфоцитов отмечены для больных с III–IV стадиями КРР. На всех стадиях развития КРР наблюдалось пониженное число CD4⁺ Т-хелперов ($p < 0,05$) и активированных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток ($p < 0,05$), а также повышенное количество CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ, $p < 0,05$). У больных КРР в уровне NK-клеток достоверных различий по сравнению с контролем не выявлено.

Мы выявили связь изменений в популяционном составе лимфоцитов с количеством CD4⁺CD39⁺ Т-клеток у больных КРР. Отмечена отрицательная корреляция между количеством CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов и CD4⁺CD39⁺ Т-клеток ($r = -0,60$, $p < 0,05$), между количеством CD3⁺CD19⁺ В-клеток и CD4⁺CD39⁺ Т-клеток ($r = -0,40$, $p < 0,05$), а также между значением иммунорегуляторного индекса (отношение клеток CD4⁺/CD8⁺) и количеством CD4⁺CD39⁺ Т-клеток ($r = -0,58$, $p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют об участии CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в иммуносупрессии при развитии КРР.

Важную роль при канцерогенезе играет субпопуляция T_{reg}-клеток. Кроме того, экспрессия T_{reg}-клетками молекулы CD39 и участие в генерации внеклеточного аденозина

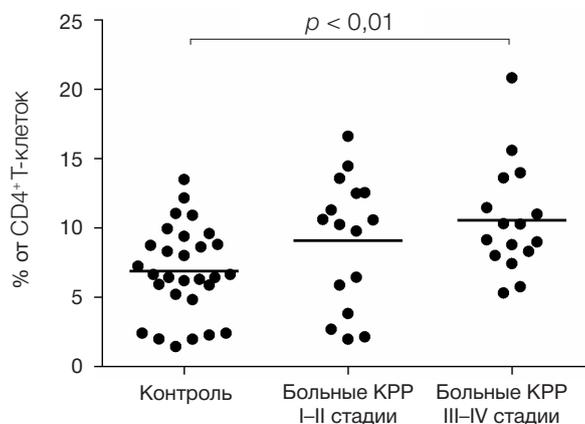


Рис. 1. Влияние КРР на содержание CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в периферической крови

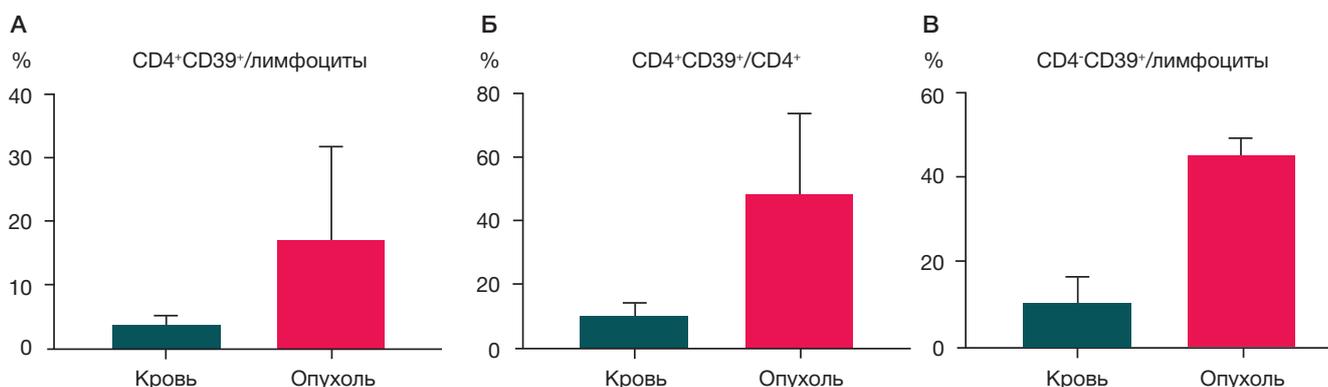


Рис. 2. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD39, в периферической крови и опухолевой ткани больных КРР
Примечание: * — различия достоверны при $p < 0,05$.

рассматривается как один из основных механизмов супрессии иммунного ответа [15, 16]. Мы исследовали содержание T_{reg} -клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$. У больных с I-II стадиями КРР количество $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ T_{reg} -клеток было увеличено по сравнению со здоровыми донорами, тогда как у больных на поздних стадиях КРР количество этих клеток не отличалось от контроля (табл. 1). Было показано, что в крови онкологических больных на T_{reg} -клетках ($CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$, $CD4^+CD25^{hi}$) происходит усиление уровня экспрессии молекулы CD39 (табл. 2).

Как видно из табл. 2, экспрессия CD39 у $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ T_{reg} -клеток увеличивается уже на начальных этапах (I-II стадии) развития опухоли по сравнению с контролем и достигает максимальных значений у больных с более поздними стадиями КРР. Такая же закономерность наблюдалась и для $CD4^+CD25^{hi}$ T_{reg} -клеток. Тогда как у клеток с фенотипом $CD4^+CD25^-$ уровень экспрессии CD39 был довольно низким и не отличался от контроля.

Кроме того, в данной работе исследовали экспрессию транскрипционного фактора T_{reg} -клеток FOXP3 и ее связь с экспрессией CD39. Показано, что между экспрессией CD39 и экспрессией FOXP3 в $CD4^+CD25^{hi}$ T_{reg} -клетках в крови больных КРР существует прямая корреляция ($r = 0,51$, $p < 0,05$). Среди ОИЛ $CD4^+CD25^{hi}$ T_{reg} -клетки также отличались от периферических более высокой экспрессией CD39. При этом почти все ОИЛ с фенотипом $CD4^+CD25^{hi}$ экспрессировали маркер CD39 (табл. 2). Однако повышенная экспрессия этой молекулы наблюдалась и у нерегуляторных клеток с фенотипом $CD4^+CD25^-$ по сравнению с периферическими лимфоцитами этих же больных. Полученные данные свидетельствуют о том, что опухоль стимулирует экспрессию CD39 на различных субпопуляциях $CD4^+$ T -лимфоцитов, включая T_{reg} -клетки.

Исследование изменения субпопуляционного состава лимфоцитов и относительного количества T_{reg} -клеток проводили и у больных ОП (табл. 1). Содержание T -лимфоцитов и $CD4^+$ T -клеток, а также количество

активированных T -хелперов у больных ОП было ниже, чем в контроле. Однако уровень экспрессии CD25 в T -хелперах больных ОП был выше, чем в контроле ($25,37 \pm 8,6\%$ и $18,09 \pm 7,5\%$ от числа $CD4^+$ T -клеток соответственно, $p < 0,05$). Изменения в соотношении субпопуляций T -клеток отразились в значительном снижении иммунорегуляторного индекса (ИРИ). Показано, что у больных ОП увеличено содержание $CD8^+$ ЦТЛ и NK -клеток по сравнению со здоровыми донорами. Таким образом, больные ОП, так же как больные КРР проявляли признаки ослабления иммунитета. Кроме того, было обнаружено, что у больных ОП число периферических $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ T_{reg} -клеток выше, чем в контроле (табл. 1).

В результате исследования экспрессии молекулы эктонуклеотидазы CD39 было обнаружено, что у больных ОП количество $CD4^+CD39^+$ T -клеток составило $9,16 \pm 2,9\%$ от $CD4^+$ T -клеток. Показано, что в уровне экспрессии CD39 T_{reg} -клетками больных ОП наблюдалась схожая с КРР закономерность. Экспрессия этой молекулы была выше в T_{reg} -клетках ($p < 0,05$) у больных ОП. Так, уровень экспрессии CD39 T_{reg} -клетками с фенотипом $CD4^+CD25^{hi}$ у больных ОП составил $57,98 \pm 19,6\%$, тогда как в $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ T_{reg} -клетках — $62,09 \pm 16,4\%$. У $CD4^+CD25^-$ лимфоцитов, не относящихся к T_{reg} -клеткам, уровень экспрессии CD39 составил $7,67 \pm 4,3\%$, достоверных отличий от контроля не выявлено.

Как и при КРР, мы исследовали степень вовлеченности популяции $CD4^+CD39^+$ T -клеток в иммунную супрессию больных ОП. Однако в результате корреляционного анализа содержания $CD4^+CD39^+$ T -клеток, уровня экспрессии этой молекулы в $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ T_{reg} -клетках и количественных изменений в популяционном составе лимфоцитов больных ОП не выявили ни одной достоверной связи, как это было при КРР.

Кроме того, нами был исследован относительный уровень экспрессии мРНК гена CD39 в лейкоцитах периферической крови больных КРР и ОП. Обнаружено, что у больных КРР уровень мРНК этого гена был в 2,36

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

Фенотипы	Контроль	Больные КРР		Больные ОП
		I-II стадии	III-IV стадии	
CD3 ⁺ (T-клетки)	69,26 ± 5,3	66,96 ± 6,4	64,02 ± 6,4*	63,87 ± 7,1*
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (T-хелперы)	42,39 ± 6,4	32,80 ± 9,5*	35,66 ± 5,9*	34,46 ± 9,1*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ (активированные T-хелперы)	10,74 ± 5,2	6,46 ± 2,7*	5,57 ± 1,8*	7,90 ± 3,2*
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (ЦТЛ)	21,98 ± 4,7	31,45 ± 6,1*	27,28 ± 6,5*#	28,20 ± 7,7*
CD3 ⁺ CD19 ⁺ (B-лимфоциты)	11,15 ± 3,0	8,13 ± 4,3*	5,99 ± 2,8*	7,90 ± 5,2
CD3 ⁺ CD16 ⁺ (NK-лимфоциты)	14,84 ± 5,7	13,39 ± 4,8	15,56 ± 8,5	17,65 ± 7,2*
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (иммунорегуляторный индекс)	2,07 ± 0,5	1,12 ± 0,5*	1,40 ± 0,4*	1,36 ± 0,7*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} (T_{reg} -клетки)	4,56 ± 1,0	5,34 ± 1,9*	4,7 ± 1,4	6,83 ± 2,7*

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

Таблица 2. Уровень экспрессии эктонуклеотидазы CD39 в популяции $CD4^+$ T -клеток у больных КРР в % от $CD4^+$ T -клеток

	CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-}
Контроль	5,58 ± 3,9	42,70 ± 5,8	41,25 ± 2,7
Больные КРР I-II стадии	5,97 ± 3,6	53,85 ± 3,9*	55,32 ± 4,1*
Больные КРР III-IV стадии	7,54 ± 3,3	66,14 ± 3,4**	67,87 ± 2,9**
ОИЛ	35,76 ± 22,6*	90,06 ± 7,1#	Нет данных

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

раза выше, чем в контроле (рис. 3). У больных ОП не было выявлено существенных отличий в уровне экспрессии транскриптов *CD39*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Внеклеточный аденозин — сигнальная молекула, модулирующая многие физиологические процессы. В последнее время активно исследуется аденозин-опосредованная супрессия иммунного ответа как один из ключевых механизмов резистентности опухоли к иммунологическому надзору. Образуется аденозин дефосфорилированием аденозинмонофосфата (АМФ) в межклеточном пространстве. Одним из ключевых ферментов в этом процессе служит эктонуклеотидаза *CD39*, обеспечивающая превращение аденозинтрифосфата (АТФ) и аденозиндифосфата (АДФ) до АМФ [8, 9].

В настоящей работе исследовали роль $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих *CD39*, в формировании иммунной супрессии у больных КРР. Нами было показано, что у больных КРР накопление периферических $CD4^+CD39^+$ клеток происходит на поздних стадиях развития опухоли. Среди ОИЛ количество $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих молекулу *CD39*, значительно выше, чем в крови тех же больных. Кроме того, у обследованных онкологических больных существует отрицательная корреляция между содержанием $CD4^+CD39^+$ Т-клеток и другими показателями, такими как количество $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, $CD3^+CD19^+$ В-клеток и значение ИПИ, что свидетельствует об участии $CD4^+CD39^+$ Т-клеток в иммуносупрессии при развитии КРР.

Важную роль в формировании иммунной супрессии при канцерогенезе и поддержании опухолевого роста отводят популяции T_{reg} -клеток. Недавно было продемонстрировано, что T_{reg} -клетки могут участвовать в накоплении внеклеточного аденозина. Они отличаются от других Т-лимфоцитов повышенной экспрессией молекулы *CD39*, необходимой для супрессорной активности этих клеток [20, 21]. Было показано, что T_{reg} -клетки, выделенные из крови $CD39^{-/-}$ -мышей проявляют низкий уровень супрессорной активности *in vitro* и не могут предотвращать отторжение трансплантата *in vivo* [22]. Поверхностная экспрессия *CD73*

(нуклеотидазы, дефосфорилирующей АМФ до аденозина) совместно с *CD39* определяется у $CD4^+CD25^+ T_{reg}$ клеток мышей. У человека $CD4^+CD25^{hi}$ Т-клетки обладают крайне низким уровнем экспрессии *CD73* [23], но при этом уровень экспрессии *CD73* в цитоплазме этих клеток выше по сравнению с $CD4^+CD25^-$ Т-лимфоцитами [21]. Более того, было продемонстрировано прямое накопление аденозина в культуре T_{reg} -клеток человека, подтверждающее, что в этих клетках *CD73* присутствует в активной форме.

В нашей работе показано, что в крови больных КРР уровень экспрессии маркера *CD39* в клетках с фенотипами $CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ был значительно выше у всех обследованных больных. При этом усиление экспрессии эктонуклеотидазы зависело от стадии заболевания. Среди ОИЛ $CD4^+CD25^{hi} T_{reg}$ -клетки также отличались от периферических более высокой экспрессией этой молекулы. Таким образом, можно заключить, что в результате процесса рекрутинга из периферического пула лимфоцитов, среди ОИЛ происходит накопление T_{reg} -клеток с высокой экспрессией *CD39*⁺. Эти клетки являются одной из доминирующих субпопуляций T_{reg} при развитии КРР, особенно на более поздних стадиях заболевания. Кроме того, $CD39^+ T_{reg}$ -клетки отличает более высокая иммуносупрессорная активность, что может оказывать негативный эффект при развитии заболевания наряду с другими механизмами иммунной супрессии.

Развитие ОП, особенно в деструктивной форме, тоже сопровождается изменением реактивности иммунной системы. Это заболевание характеризуется воспалением поджелудочной железы с возможным вовлечением перипанкреатических тканей и формированием полиорганной функциональной недостаточности, которая в свою очередь возникает в следствие панкреонекроза, развития инфекции и сепсиса [24]. Предполагается, что выраженность иммунных характеристик синдрома системного воспалительного ответа может индуцировать развитие иммуносупрессии, что приводит к неспособности организма противостоять микробной агрессии и, как следствие, к развитию гнойно-некротических осложнений [25].

Полученные нами данные об изменениях в субпопуляционном составе лимфоцитов, повышенном содержании T_{reg} -клеток у больных ОП могут свидетельствовать

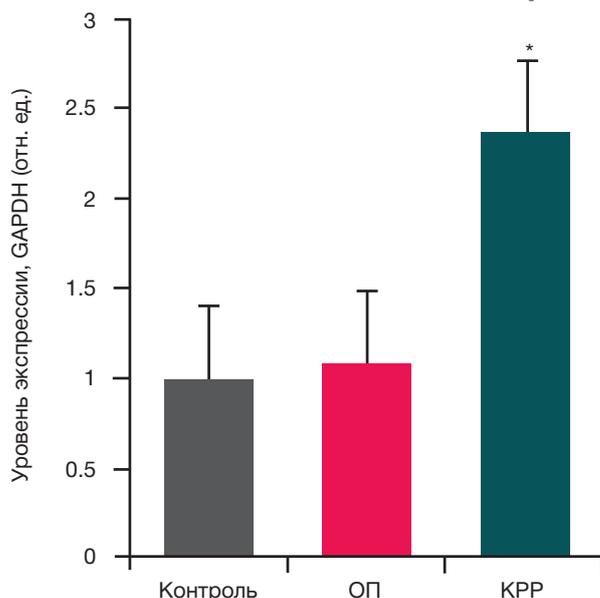


Рис. 3. Изменение уровня мРНК гена *CD39* в лейкоцитах периферической крови больных КРР и ОП (относительно мРНК *GAPDH*)

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$, данные представлены в виде $M \pm SE$.

о развитии иммунной супрессии при данном заболевании. Учитывая повышенное содержание T_{reg} -клеток, а также воспалительный характер заболевания и увеличение уровня апоптоза циркулирующих лимфоцитов [26], предполагается, что развитие иммунной супрессии у таких больных представляет компенсаторный механизм, ограничивающий развитие воспалительной реакции.

В отличие от пациентов с КРР, у больных ОП содержание $CD4^+CD39^+$ клеток не отличалось от контроля. Не выявлено корреляции между содержанием основных популяций лимфоцитов и уровнем $CD4^+CD39^+$ Т-клеток. Отмечено, что у больных ОП был увеличен уровень экспрессии CD39 на T_{reg} -клетках ($CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$) по сравнению с контролем, что, возможно, связано с повышенным количеством самих T_{reg} -клеток в крови этих больных. По-видимому, у больных ОП $CD4^+CD39^+$ Т-клетки не вносят значительного вклада в развитие системной иммуносупрессии, как при канцерогенезе. Об этом также свидетельствуют полученные нами результаты анализа относительного уровня мРНК гена *CD39* у больных КРР и ОП. Было показано, что у больных КРР уровень мРНК

CD39 увеличивался в процессе развития заболевания, достигая максимальных значений на поздних стадиях КРР. В то же время, у больных ОП уровень экспрессии *CD39* не отличался от контроля.

ВЫВОДЫ

В условиях развития КРР значительно повышается количество $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих маркер *CD39*, особенно интенсивное накопление $CD39^+$ клеток наблюдается среди ОИЛ. Эти клетки играют существенную роль в формировании иммунной супрессии у больных КРР. Значительную долю клеток, экспрессирующих *CD39*, составляют T_{reg} -лимфоциты. Блокировка экспрессии эктонуклеотидазы *CD39* и/или ограничение функционирования T_{reg} -клеток представляет интерес для разработки новых подходов к противоопухолевой терапии. Необходимы дальнейшие исследования для детального понимания механизмов аденозин-*A2AR*-опосредованной иммунной супрессии у онкологических больных.

Литература

- Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В., редакторы. Состояние онкологической помощи населению России в 2015. М.: МНИОИ им. Герцена; 2016. 250 с.
- Циммерман Я. С. Колоректальный рак: современное состояние проблемы. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2012; 22 (4): 5–17.
- Mougiakakos D. Regulatory T cells in colorectal cancer: from biology to prognostic relevance. *Cancers*. 2011; 3: 1708–31.
- Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 186–92.
- Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumor-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol.* 2010; 222 (4): 4350–66.
- Lutgens MW, Vleggaar FP, Schipper ME, Stokkers PC, van der Woude CJ, Hommes DW, et al. High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2008; 57: 1246–51.
- Lasry A, Zinger A, Ben-Neria Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol.* 2016; 17 (3): 230–40.
- Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13: 842–57.
- Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013; 19: 355–67.
- Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 5947–52.
- Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enyoloji K, Cszimadia E, et al. Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in *cd39/Entpd1*-null mice. *Am J Pathol.* 2007; 171: 1395–404.
- Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Moller A, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res*. 2012; 72: 2190–6.
- Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol.* 2012; 33: 231–7.
- Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*. 2013; 32: 1743–51.
- Кравченко П. Н., Жулай Г. А., Чуров А. В., Олейник Е. К., Олейник В. М., Барышева О. Ю. и др. Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови больных ревматоидным артритом. Вестник РАМН. 2016; 71(2): 148–153.
- Чуров А. В. Регуляторные Т-клетки и старение организма. Успехи геронтологии. 2013; 26 (4): 603–609.
- Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunological Reviews*. 2014; 259 (1): 192–205.
- Whiteside TL. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol Immunother*. 2014; 63: 67–72.
- 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; 62 (1): 96–100.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007; 204: 1257–65.
- Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czyszowska M, Szajnik M, Ren J, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ regulatory T cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285: 7176–86.
- Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol*. 2010; 185: 1993–98.
- Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal*. 2007; 3: 171–80.
- Al Mofleh IA. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 675–84.
- Винник Ю. С., Черданцев Д. В., Салмина А. Б., Маркелова Н. М., Миллер С. В. Особенности регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток крови при остром деструктивном панкреатите. Новости хирургии. 2011; 9 (2): 37–42.
- Zhang XP, Chen HQ, Liu F, Zhang J. Advances in researches on the immune dysregulation and therapy of severe acute pancreatitis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009; 10 (7): 493–8.

References

- Kaprin AD, Starinski VV, Petrova GV. Sostoyanie onkologicheskoi pomoshi naseliniyu Rossii v 2015. M.: MNIOL im. Gerchena; 2016. 250 s. Russian.
- Tsimmerman YaS. Colorectal cancer: state-of-the-art. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2012; 22 (4): 5–17. Russian.
- Mougiakakos D. Regulatory T cells in colorectal cancer: from biology to prognostic relevance. *Cancers*. 2011; 3: 1708–31.
- Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 186–92.
- Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol*. 2010; 222 (4): 4350–66.
- Lutgens MW, Vleggaar FP, Schipper ME, Stokkers PC, van der Woude CJ, Hommes DW, et al. High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2008; 57: 1246–51.
- Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol*. 2016; 17 (3): 230–40.
- Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13: 842–57.
- Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013; 19: 355–67.
- Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 5947–52.
- Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enjyoji K, Cszimadia E, et al. Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice. *Am J Pathol*. 2007; 171: 1395–404.
- Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Moller A, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res*. 2012; 72: 2190–6.
- Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*. 2012; 33: 231–7.
- Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*. 2013; 32: 1743–51.
- Kravchenko PN, Zhulai GA, Churov AV, Oleinik EK, Oleinik VM, Barysheva OYu, i dr. Subpopulations of Regulatory T-lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016; 71 (2): 148–153. Russian.
- Churov AV. Regulatory T cells and aging. *Advances in gerontology*. 2013; 26 (4): 603–609. Russian.
- Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunological Reviews*. 2014; 259 (1): 192–205.
- Whiteside TL. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol Immunother*. 2014; 63: 67–72.
- Zhulai GA, Oleinik EK, Romanov AA, Oleinik VM, Churov AV, Kravchenko PN. Circulating regulatory T-cells and changes in the subpopulation composition of lymphocytes in colorectal cancer patients. *Problems in oncology*. 2016; 62 (1): 96–100. Russian.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007; 204: 1257–65.
- Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285: 7176–86.
- Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol*. 2010; 185: 1993–98.
- Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal*. 2007; 3: 171–80.
- Al Mofleh IA. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 675–84.
- Vinnik YuS, Cherdancev DV, Salmina AB, Markelova NM, Miller SV. Osobennosti regulyacii apoptoza immunokompetentnih kletok pri ostrom destruktivnom pankreatite. *Novosti hirurgii*. 2011; 9 (2): 37–42. Russian.
- Zhang XP, Chen HQ, Liu F, Zhang J. Advances in researches on the immune dysregulation and therapy of severe acute pancreatitis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009; 10 (7): 493–8.