
ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ CD25⁺CD4⁺ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ РАКЕ И АДЕНОМЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.М. Агаев, В.П. Авдошин

Кафедра урологии и оперативной нефрологии
Российский университет дружбы народов
ГКБ № 29
Госпитальная пл., 2, Москва, Россия, 111020

**Е.Ю. Москалева, О.Н. Попова,
С.Е. Северин**

ГУЗ «Московский НИИ медицинской экологии»
Симферопольский б-р, 8, Москва, Россия, 117149

CD4⁺CD25⁺ регуляторные Т-лимфоциты (Трег) ингибируют индукцию и функции антиген-специфических Т-клеток при активации клеточного антигенспецифического иммунного ответа. Повышенный уровень Трег обнаружен у больных при различных типах опухолей. Целью работы явилось изучение содержания CD4⁺CD25⁺ клеток в периферической крови у больных раком и у больных аденомой предстательной железы (РПЖ и АПЖ) в сравнении с больными мочекаменной болезнью, у которых опухолей не было (группа контроля). Уровень Трег в периферической крови определяли с помощью проточной цитофлуориметрии, статистический анализ проводили с использованием метода Стьюдента. У больных АПЖ и РПЖ обнаружено достоверное повышение уровня Трег. Полученные результаты свидетельствуют о возможной роли Трег в подавлении иммунного ответа не только у больных РПЖ, но и при АПЖ. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности проведения исследований, направленных на ингибирование Трег у больных АПЖ и РПЖ.

Ключевые слова: регуляторные Т-лимфоциты, периферическая кровь, рак предстательной железы, аденома предстательной железы, мочекаменная болезнь.

Иммунологические исследования позволили установить, что причиной подавления противоопухолевого иммунного ответа и низкой эффективности противоопухолевых вакцин при многих злокачественных заболеваниях, в том числе при раке предстательной железы (РПЖ), является появление специфических клеток-супрессоров — CD25⁺CD4⁺ регуляторных Т-лимфоцитов (Трег). Эти клетки обеспечивают толерантность иммунной системы к аутоантигенам и ингибируют клеточный противоопухолевый иммунный ответ, так как опухолевые антигены, также как аутоантигены нормальных клеток, могут активировать Трег [1, 2].

CD25⁺CD4⁺ Трег характеризуются экспрессией нескольких типов специфических молекул, определяющих их функции. Это FOXP3 (ген, кодирующий фактор транскрипции белок Scurfin), рецептор ИЛ-2, молекула CTLA-4-ассоциированный с ЦТЛ антиген-4 (cytotoxic lymphocyte-associated, antigen-4) и GITR-индуцируемый глюкокортикоидами рецептор TNF (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) [3].

Уровень Трег среди лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, может служить показателем степени подавления противоопухолевого иммунитета [4] и связан с плохим прогнозом, по крайней мере, при раке яичников и раке желудка [5, 6].

В литературе имеется несколько сообщений об увеличении уровня Трег при РПЖ [7—9]. Так показано, что содержание Трег возрастает в опухолевой ткани и в периферической крови у больных РПЖ [8]. Эти же авторы показали, что Трег, выделенные и из ткани опухоли, и из периферической крови, обладали иммуносупрессорной активностью. Полагают, что Трег появляются уже на ранней стадии опухолевого процесса и что необходимо создание методов подавления или элиминации Трег для отмены иммуносупрессии и активации противоопухолевого иммунитета у больных. При РПЖ уровень Трег возрастает по мере прогрессии заболевания и их содержание необходимо учитывать при назначении иммунотерапии [8, 9].

При изучении культур лимфоцитов больных РПЖ после стимуляции *in vitro* дендритными клетками, нагруженными смесью специфических для РПЖ антигенов, обнаружен более низкий прирост лимфоцитов, чем в культурах от здоровых добровольцев и более низкая продукция ИФγ при повышенной продукции ИЛ-4 [10]. Эти результаты также свидетельствуют о подавлении клеточного противоопухолевого иммунитета, которое может быть связано с присутствием в периферической крови таких больных повышенного уровня Трег.

При аденоме предстательной железы (доброкачественной гиперплазии предстательной железы) — часто встречающейся доброкачественной опухоли у мужчин — сведения об уровне Трег практически отсутствуют.

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование уровня Трег (CD4⁺CD25⁺-клеток) в периферической крови больных при РПЖ в сравнении с больными, страдающими другими урологическими заболеваниями — аденомой (доброкачественная гиперплазия) предстательной железы (АПЖ) и мочекаменной болезнью (МКБ).

Материалы и методы. Обследовано 15 пациентов с верифицированным диагнозом РПЖ в возрасте от 59 до 81 года, 9 пациентов с диагнозом АПЖ в возрасте от 61 до 85 лет и 9 пациентов с МКБ в возрасте от 30 до 72 лет без лейко- и лимфопении и лейкоцитоза, находившихся на стационарном лечении в 1-м и 2-м урологическом отделениях ГКБ № 29 им. Н.Э. Баумана. Клиническое исследование включало изучение анамнеза и данных объективного исследования с использованием обычных лабораторно-инструментальных методов. Уровень простатаспецифического антигена (ПСА) у пациентов с диагнозом РПЖ составлял от 6,3 до 110 нг/мл. Контрольной группой считали пациентов, которые находились на стационарном лечении с диагнозом МКБ.

Выделение лимфоцитов проводили с использованием раствора фиколл-пак, на который наслаивали разведенную в два раза фосфатно-буферным раствором (ФСБ) кровь. Пробирки центрифугировали в бакет-роторе 30 мин. при 400 × g при 20 °С. Верхнюю фазу, содержащую плазму, отбрасывали. Лимфоциты, концентрирующиеся в виде кольца на границе раздела между плазмой и средой разделения, собирали в центрифужную пробирку, осторожно отсасывая пипеткой,

промывали два раза ФСБ, центрифугируя суспензию 10 мин. при 250 × g, и суспендировали в ФСБ для последующего исследования фенотипа лимфоцитов.

Анализ фенотипа субпопуляций лимфоцитов проводили при помощи точного цитофлуориметра клеток EPICS-C (Coulter Electronics, Florida, USA). Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер Argon-Innova 90-6 (Coherent, USA) с длиной волны 488 нм. Суспензию лимфоцитов инкубировали с моноклональными антителами фирмы «Сорбент» (Россия) к CD8, CD4 и CD25-антигенам поверхности лимфоцитов. Трег выявляли по присутствию на этих клетках двойной флуоресцентной метки: ФИТЦ (флуоресцеин изотиоцианат, желто-зеленая флуоресценция) для антител к CD25 и фикоэритрин (красная флуоресценция) для антител, выявляющих CD4 антиген.

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с помощью компьютерной обработки данных в программе Microcal Origin 5,0.

Результаты и обсуждение. Для характеристики иммунного статуса в периферической крови пациентов исследовали содержание CD8⁺, CD4⁺, CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов и рассчитывали иммунорегуляторный индекс (ИРИ) — соотношение CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов. Гематологические показатели у обследованных лиц, как отмечено выше, были в пределах уровня нормы и лейко- и лимфопении, а также лейкоцитоза не наблюдали. Уровень нормы для исследуемых показателей при использовании антител фирмы «Сорбент» по данным фирмы-производителя составляет для CD8⁺, CD4⁺ и CD25⁺ лимфоцитов 23 ± 4%, 39 ± 5% и 0 ± 0% соответственно. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Иммунный статус обследованных пациентов с мочекаменной болезнью, аденомой и раком предстательной железы

Исследуемые показатели	Группы обследованных больных по заболеванию		
	мочекаменная болезнь (МКБ)	аденома предстательной железы (АПЖ)	рак предстательной железы (РПЖ)
CD4, %	45,70 ± 3,40	33,40 ± 2,70 * ₁₋₂	50,40 ± 3,20 * ₂₋₃
CD8, %	17,30 ± 1,80	7,90 ± 1,80 * ₁₋₂	14,70 ± 1,00 * ₂₋₃
ИРИ, усл. ед.	2,90 ± 0,50	7,60 ± 2,40 * ₁₋₂	2,50 ± 0,50 * ₂₋₃
CD25, %	0,20 ± 0,04	0,52 ± 0,17	0,89 ± 0,28
CD4/CD25, %	0,11 ± 0,03	0,33 ± 0,09 * ₁₋₂	0,47 ± 0,13 * ₁₋₃

Примечание: * — p < 0,05 для указанных групп.

Из приведенных данных следует, что при МКБ иммунный статус пациентов практически не отличается от иммунного статуса здоровых добровольцев, за исключением присутствия в периферической крови небольшого количества CD25⁺ лимфоцитов, что подтверждает правомочность использования параметров, наблюдаемых у пациентов при МКБ, в качестве контроля.

У пациентов с АПЖ обнаружены статистически значимые изменения иммунного статуса, заключающиеся в снижении уровня $CD8^+$ лимфоцитов и, соответственно, в увеличении ИРИ. Уровень $CD25^+$ -лимфоцитов у пациентов с АПЖ был выше, чем в контрольной группе (у пациентов с МКБ и в норме).

У пациентов с РПЖ статистически значимых изменений изученных показателей иммунного статуса по сравнению с МКБ не обнаружено, но уровень $CD25^+$ -лимфоцитов был также выше нормы (но $p > 0,05$) и был наиболее высоким среди рассматриваемых групп урологических заболеваний.

Анализируя уровень $CD4^+CD25^+$ -лимфоцитов при МКБ, АПЖ и РПЖ (табл. 1) необходимо отметить статистически значимое повышение этого показателя как при АПЖ, так и при РПЖ. При этом наиболее высоким уровень Трег был при РПЖ.

Следует отметить, что у пациентов сравниваемых групп различалось количество $CD4$ -лимфоцитов. Поэтому, помимо содержания $CD4^+CD25^+$ -лимфоцитов, определяли и долю $CD4^+CD25^+$ -клеток во фракции $CD4^+$ -лимфоцитов. Полученные результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что и при АПЖ, и при РПЖ содержание $CD4^+CD25^+$ -клеток во фракции $CD4^+$ -лимфоцитов достоверно превышает этот показатель в контрольной группе — группе пациентов с МКБ. При этом необходимо отметить значительные межиндивидуальные различия в уровне Трег при АПЖ и РПЖ. Содержание Трег было повышено лишь у части пациентов, в то время как у другой части больных этот показатель не отличался от соответствующих значений в контрольной группе. В контрольной группе межиндивидуальные различия содержания $CD4^+CD25^+$ -лимфоцитов были незначительны.

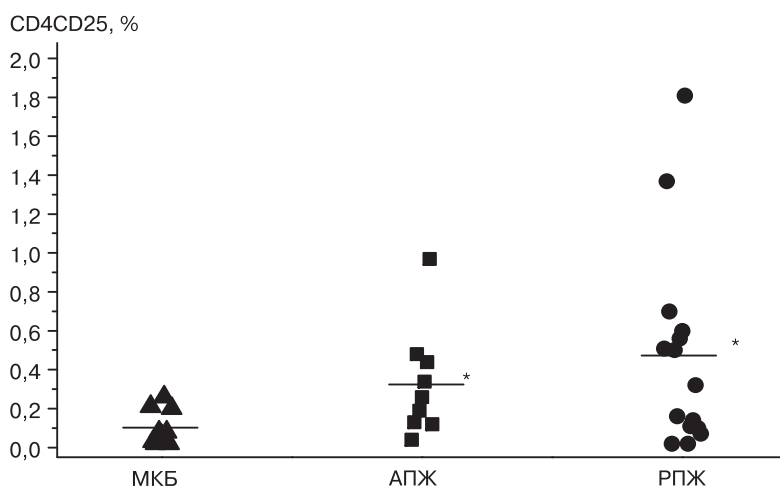


Рис. 1. Содержание $CD4^+CD25^+$ лимфоцитов в процентах от уровня $CD4^+$ лимфоцитов у пациентов с мочекаменной болезнью (МКБ), аденомой (АПЖ) и раком предстательной железы (РПЖ)

* — $p < 0,05$ по сравнению с пациентами с МКБ

Для оценки роли уровня Трег в прогнозе клинического течения заболевания при РПЖ сравнивали содержание CD4⁺CD25⁺-лимфоцитов в группах пациентов с разным уровнем ПСА, так как известно, что определение концентрации ПСА является общепринятым подходом не только для диагностики РПЖ, но и для мониторинга течения заболевания и эффективности его лечения [11]. Полученные результаты представлены на рис. 2.

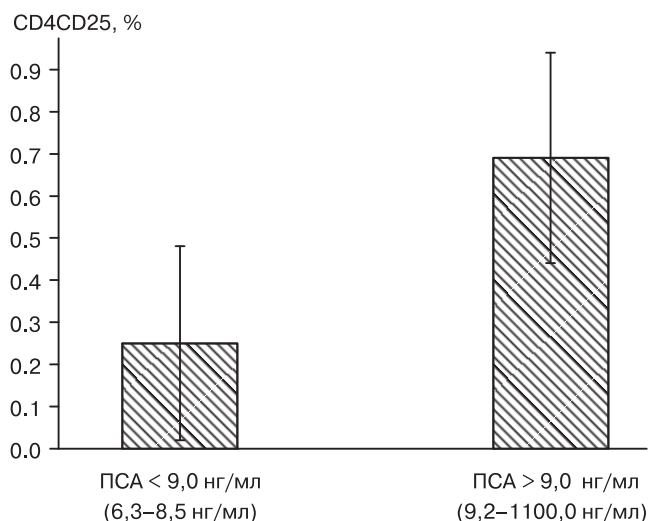


Рис. 2. Уровень регуляторных Т-лимфоцитов у больных раком предстательной железы с разным содержанием ПСА в сыворотке крови

Обнаружено, что содержание CD4⁺CD25⁺ наиболее высоко в группе больных с более высоким уровнем ПСА. Это позволяет полагать, что высокий уровень содержания CD4⁺CD25⁺-лимфоцитов в периферической крови при РПЖ и, по-видимому, при АПЖ может рассматриваться как дополнительный показатель плохого прогноза. Повышение Трег в периферической крови при АПЖ обнаружено впервые и может играть важную роль в процессе злокачественной трансформации клеток АПЖ.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Adler A.J. Mechanisms of T cell tolerance and suppression in cancer mediated by tumor-associated antigens and hormones // *Curr Cancer Drug Targets*. — 2007. — 7. — P. 3—14.
- [2] Schlom J., Arlen P.M., Gulley J.L. Cancer vaccines: moving beyond current paradigms. // *Clin. Cancer Res*. — 2007. — V. 13. — P. 3776—3782.
- [3] Sakauchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self // *Nat. Immunol*. — 2005. — V. 6. — P. 345—352.
- [4] Curiel T.J., Coukos G., Zou L. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival // *Nat. Med*. — 2004. — V. 10. — P. 942—949.
- [5] Sasada T., Kimura M., Yoshida Y. et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression // *Cancer* — 2003. — V. 98. — P. 1089—99.

- [6] Ko K., Yamazaki S., Nakamura K. et al. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells // J. Exp. Med. — 2005. — V. 202. — P. 885—891.
- [7] Wolf A.M., Wolf D., Steurer M. et al. Increase of regulatory T Cells in the peripheral blood of cancer patients // Clinical Cancer Research. — 2003. — V. 9. — P. 606—612.
- [8] Miller M., Lundberg K., Ozenci V. et al. CD4⁺CD25⁺ T Cells are enriched in the tumor and peripheral blood and prostate cancer patients // J. Immunol. — 2006. — V. 177. — P. 7398—7405.
- [9] Yokokawa J., Cereda V., Remondo C. et al. Enhanced Functionality of CD4⁺CD25⁺ high FoxP3⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer // Clin Cancer Res. — 2008. — V. 14. — 4. — P. 1032—1040.
- [10] Москалева Е.Ю., Хомякова А.В., Позднякова Л.П. и др. Продукция интерферона-γ лимфоцитами больных раком предстательной железы при индукции противоопухолевого Т-клеточного иммунного ответа с помощью дендритных клеток in vitro // Иммунология. — 2008. — 1. — С. 10—15.
- [11] Catalona W., Smith D., Ratliff T. et al. Measurement of prostatespecific antigen in serum a screening test for prostate cancer // New Engl. J. Med. — 1991. — V. 324. — P. 1156—1161.

CD25⁺CD4⁺ REGULATORY T LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH PROSTATE CANCER AND PROSTATE ADENOMA

N.M. Agaev, V.P. Avdoshin

Chair of Urology and Operative Nephrology
Medical faculty
Peoples' Friendship University of Russia
City Hospital № 29
Gospitalnaya sq., 2, Moscow, Russia, 111020

**E.YU. Moskaleva, O.N. Popova,
S.E. Severin**

SDH «Moscow institute of medical ecology»
Sympheropolsky blvd, 8, Moscow, Russia, 117149

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg) have been shown to inhibit the activation and function of T cells that participate in antigen-specific immune responses. Higher levels of Tregs have been reported in the peripheral blood of patients with several types of tumors. The aim of this work was the investigation of the number of CD4⁺CD25⁺ cells in peripheral blood of patients with prostate cancer (PC), prostate adenoma (PA) and urolithiasis as control group. Levels of Tregs in the peripheral blood of patients were measured by flow cytometry. Data were analyzed using unpaired Students t test. The levels of Tregs in the peripheral blood of patients with PC and PA were significantly higher than those in control group. These findings show the potential importance of Tregs in modifying immune responses not only in patients with PC but in patients with PA too. Although longer studies are necessary to confirm these findings, these studies also show for the first time the differences in Treg level in peripheral blood of patients with PA, and thus, provide a basis for immunotherapy trials involving the inhibition of Tregs in prostate adenoma and PCa patients.

Key words: regulatory T lymphocytes, peripheral blood, prostate cancer, prostate adenoma, urolithiasis.