

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Н. Н. Тупицын¹, Т. М. Джуманазаров¹, А. Д. Палладина¹, А. К. Аллахвердиев^{2,3},
С. В. Чулкова^{1,4}, П. В. Кононец¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр им. А. С. Логинова
Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;
Россия 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

⁴ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова»
Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а

Контакты: Николай Николаевич Тупицын nntca@yahoo.com

Введение. Костный мозг — место генерации значительной части иммунокомпетентных клеток и в то же время периферический лимфоидный орган, в котором накапливаются эффекторные клетки и клетки памяти противоопухолевого иммунитета. Этот орган еще недостаточно изучен при опухолях.

Цель исследования — изучение иммунокомпетентных клеток костного мозга пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 68 больных, у которых были диагностированы плоскоклеточный рак легкого ($n = 28$), аденокарцинома ($n = 38$) и другие формы рака легкого ($n = 2$). Во всех случаях, помимо стандартных методов диагностики и стадирования, исследовали костный мозг больных — морфологию (миелограмму) и субпопуляции лимфоцитов. При изучении субпопуляционного состава применяли метод многоцветной проточной цитометрии. Изучены Т-клетки и их субпопуляции, В-лимфоциты, NK-клетки, перфоринсодержащие лимфоциты, экспрессия костимуляторной молекулы CD27.

Результаты. В ходе исследования плоскоклеточный рак легкого характеризовался более высоким содержанием костномозговых зрелых Т-клеток (CD3) и CD8-лимфоцитов. Для аденокарциномы была типичной В-клеточная реакция (CD20). Эффекторные (перфоринсодержащие) популяции лимфоцитов костного мозга также имели связь с гистологическим диагнозом рака легкого: для аденокарциномы были более типичны CD4-положительные цитотоксические лимфоциты и экспрессия на эффекторах CD27. Перфоринсодержащие лимфоидные клетки костного мозга находились в реципрокных отношениях с эритрокариоцитами.

Заключение. Субпопуляционный состав клеток костного мозга имеет взаимосвязь с гистологическим вариантом рака и эритропозом у больных раком легкого.

Ключевые слова: рак легкого, костный мозг, Т-клетки, CD8, CD20, CD27, перфорин, эритрокариоциты

Для цитирования: Тупицын Н. Н., Джуманазаров Т. М., Палладина А. Д. и др. Иммунологические показатели костного мозга больных немелкоклеточным раком легкого. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):47–54.

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-47-54



IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF BONE MARROW IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

N. N. Tupitsyn¹, T. M. Dzumanazarov¹, A. D. Palladina¹, A. K. Allahverdiev^{2,3}, S. V. Chulkova^{1,4}, P. V. Kononetz¹

¹N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Moscow Clinical Scientific and Practical Center of Moscow Department of Healthcare; 86 Shosse Entuziastov, Moscow 111123, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of Russia;
Russia; Build 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia;

⁴N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovitianov St., Moscow 117997, Russia

Introduction. Generation of most immunocompetent cells takes place in bone marrow. Bone marrow is a peripheral lymphoid organ where antitumor effector cells and memory cells are present.

The aim of the work is to estimate peripheral lymphoid cell subpopulations in bone marrow of lung cancer patients.

Materials and methods. Study has been done in 68 pts with lung cancer: squamous cell cancer ($n = 28$), adenocarcinoma ($n = 38$), other forms ($n = 2$). In all cases standard diagnostic and staging procedures were performed, as well as morphological (myelogram) and

immunological study of bone marrow lymphocyte subpopulations. Multicolor Flow cytometry was used for study of bone marrow lymphocyte populations. We studied T-cells and its subpopulations, B-cells, NK-cells, perforin-positive cells, and CD27-positive cells.

Results. *Squamous cell lung cancer was characterized by higher content of bone marrow mature T-cells (CD3), and CD8 lymphocytes. More typical for adenocarcinoma was mature B-cell reaction (CD20). Effector (perforin-positive) populations of lymphocytes also were related to histological type of cancer: for adenocarcinoma presence of CD4-positive cytotoxic lymphocytes and CD27-expression on effector cells. Perforin-containing lymphoid cells were in opposite correlation to erythrocytes.*

Conclusion. *Subpopulational lymphocyte content of bone marrow is related to histological variant of cancer and erythropoiesis in lung cancer patients.*

Key words: lung cancer, bone marrow, T-cells, CD8, CD20, CD27, perforin, erythrocytes

For citation: Tupitsyn N.N., Dzugumanazarov T.M., Palladina A.D. et al. Immunological parameters of bone marrow in non-small cell lung cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(2):47–54. (In Russ.).

Введение

Рак легкого — один из наиболее типичных примеров успешного применения иммунотерапии в онкологии. Достижения связаны в основном с использованием ингибиторов контрольных точек иммунного ответа — антител к CTLA-4, PD-1, PD-L1 и т.д. [1]. Использование препаратов данной группы позволило добиться больших успехов в лечении рака легкого и отчетливо показать, что влияние на иммунную систему пациента может быть не менее эффективным, чем цитотоксическое воздействие на саму опухоль. Важно отметить, что в этой бурно развивающейся области идет постоянная эволюция лечебных подходов и возникает понимание необходимости разработки не только новых ингибиторов контрольных точек, но и агонистов ряда костимуляторных молекул (например, CD27 — варлиумаб) для реализации эффективного противоопухолевого иммунного ответа [2]. В ряде исследований отмечен не только клинический эффект агониста CD27, но и синергизм действия с блокаторами PD-1 [3].

Интенсивно развиваются методы оценки иммунологических параметров при раке легкого, а также определения мишеней иммунотерапии для предсказания эффекта лечения. Достаточно хорошо изучены лимфоидные клетки крови, интратуморальные лимфоциты и собственно опухолевые клетки.

Значительно меньшее внимание уделено костному мозгу (КМ) больных раком легкого. Публикаций на этот счет практически нет. А ведь именно в КМ происходит на начальных этапах генерация NK-клеточных и В-линейных эффекторов противоопухолевого иммунитета, а в дальнейшем — накопление Т-клеточных (включая регуляторные клетки) эффекторов противоопухолевого иммунитета и клеток памяти.

Статья посвящена исследованию субпопуляций зрелых лимфоцитов КМ больных немелкоклеточным раком легкого.

Материалы и методы

Исследование проведено с участием 68 больных немелкоклеточным раком легкого: 52 (76,5 %) муж-

чин и 16 (23,5 %) женщин в возрасте от 17 до 80 лет (средний возраст пациентов 63,9 года). У 28 (41,8 %) больных был установлен плоскоклеточный рак, у 38 — аденокарцинома, в 2 случаях — другие формы рака.

Распределение больных по стадиям было следующим: IA — 8 (11,8 %), IB — 15 (22,1 %), IIA — 13 (19,1 %), IIB — 8 (11,8 %), IIIA — 14 (20,6 %), IIIB — 4 (5,9 %), IV — 6 (8,8 %). Преобладали больные со стадиями заболевания IB (22,1 %), IIA (19,1 %), IIIA (20,6 %).

В соответствии с размером первичной опухоли (pT) распределение было следующим: T1a — 4 (5,9 %), T1b — 7 (10,3 %), T2a — 31 (45,6 %), T2b — 7 (10,3 %), T3 — 12 (17,6 %), T4 — 7 (10,3 %). Преобладали больные с отсутствием метастазов в регионарных лимфатических узлах (N0) — 32 (47,1 %), N1 — 21 (30,9 %), N2 — 12 (17,6 %), N3 — 2 (2,9 %), лишь в одном случае индекс N не был установлен (Nx) — 1,5 %. Отдаленные метастазы выявлены у 6 (8,8 %) больных.

Помимо стандартного клинико-лабораторного обследования у всех пациентов был изучен КМ как морфологическим методом (миелограмма), так и иммунологически. Иммунологически были изучены основные субпопуляции Т- и В-лимфоцитов — CD3, CD4, CD8, CD19/CD20, NK-клеток (CD16⁺CD3⁻) и ряд дополнительных характеристик лимфоцитов по степени зрелости (CD27), цитотоксическому потенциалу (перфорин), экспрессии CD25.

Субпопуляции костномозговых лимфоцитов были изучены проточно-цитометрически в гейте зрелых лимфоцитов, определяемых на основании выраженной экспрессии CD45 в сочетании с низкими характеристиками SSC (боковое рассеяние света лазерного луча). Анализ цитометрических данных проводили с использованием программы FSC v. 3 на персональном компьютере.

Результаты

В целом в группе больных немелкоклеточным раком легкого средний возраст мужчин и женщин не различался: возраст мужчин — $64,5 \pm 1,1$, женщин — $63,3 \pm 2,4$ года ($p = 0,59$). Отмечена четкая связь

гистологического диагноза с полом больных ($p = 0,00$) (табл. 1).

Как видно, женщин, больных плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ), в анализируемой группе не было. В то же время аденокарцинома наблюдалась с примерно равной частотой у мужчин и женщин.

Среднее содержание зрелых Т-клеток ($CD3^+$) в анализируемой группе больных ($n = 42$) составило 67,1 % (31,3–82 %). У мужчин содержание зрелых Т-лимфоцитов было достоверно более высоким, чем у женщин ($69,3 \pm 2,1$ %, $n = 33$, и $58,8 \pm 2,96$ %, $n = 9$), $p = 0,01$. Достоверные различия по данному показателю ($CD3^+$ -клетки) отмечены при сопоставлении гистологических типов рака легкого: при ПКРЛ уровни $CD3^+$ -лимфоцитов в КМ больных были более высокими (в среднем 73 %, $n = 19$), чем при аденокарциноме (в среднем 63 %, $n = 22$), $p = 0,003$. Уровни $CD8^+$ -лимфоцитов также были достоверно более высокими у мужчин: $32,4 \pm 1,8$ % ($n = 32$) и $23,6 \pm 2,0$ % ($n = 9$), $p = 0,003$. Уровни $CD4^+$ -лимфоцитов не различались в зависимости от пола ($p = 0,9$).

Таблица 1. Связь гистологического диагноза с полом больных раком легкого

Table 1. The relationship of histological diagnosis with the gender of patients with lung cancer

Пол больных Patients' gender	Плоскоклеточный рак легкого, абс. (%) Squamous-cell carcinoma, abs. (%)	Аденокарцинома, абс. (%) Adenocarcinoma, abs. (%)	Абс. (%) Abs. (%)
Мужской Male	28 (56,0)	22 (44,0)	50 (100,0)
Женский Female	0 (0,0)	16 (100,0)	16 (100,0)
<i>Всего</i> <i>Total</i>	<i>28 (42,4)</i>	<i>38 (57,6)</i>	<i>66 (100,0)</i>

Мы оценили, насколько взаимосвязаны пол пациентов и уровни Т-клеток и $CD8^+$ -лимфоцитов при аденокарциноме легкого: были представлены и мужчины, и женщины в примерно равной пропорции. Хотя некоторое преобладание $CD3^+$ - и $CD8^+$ -клеток у мужчин и было, достоверных различий не получено (табл. 2).

Эти данные свидетельствуют о том, что уровни $CD3^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов в КМ больных раком легкого более вероятно ассоциированы с гистологическим диагнозом, нежели с полом пациентов.

Как и следовало предполагать, исходя из высокой ассоциации гистологического типа рака легкого с полом, достоверно более высокие уровни $CD8^+$ -лимфоцитов отмечены при ПКРЛ: $34,1 \pm 2,4$ % ($n = 19$) и $27,3 \pm 1,9$ % ($n = 22$), $p = 0,03$. В отношении $CD4^+$ -лимфоцитов такой взаимосвязи не отмечено ($p = 0,35$).

Таблица 2. Уровни $CD3^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов у мужчин и женщин, больных аденокарциномой легкого

Table 2. Levels of $CD3^+$ - and $CD8^+$ -lymphocytes in men and women with lung adenocarcinoma

Показатель Parameter	Пол больных Patients' gender	n	Среднее Mean	Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	p
$CD3^+$	Мужской Male	13	66,62	3,39	–
	Женский Female	9	58,84	2,95	0,12
$CD8^+$	Мужской Male	13	29,89	2,69	–
	Женский Female	9	23,59	2,00	0,1

Примечание. Здесь и в табл. 3–5: n – число больных; p – уровень значимости различий.

Note. Here and in tables 3–5: n – patients' number; p – significance level.

Интересные данные получены при проведении сравнений в гейте Т-клеток: субпопуляции Т-цитотоксических лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) достоверно не различались в зависимости от пола больных ($p = 0,127$). Аналогично и гистологические типы рака легкого (плоскоклеточный, аденокарцинома) не различались по уровням цитотоксических $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов ($p = 0,52$). Сравнение средних значений НК-клеток ($CD16^+CD3^-$) также не выявило связи с полом ($p = 0,52$). Различий в уровнях костномозговых НК-клеток при ПКРЛ и аденокарциноме не установлено ($p = 0,57$).

Таким образом, у больных раком легкого преобладание зрелой Т-клеточной популяции лимфоцитов КМ ($CD3$) отмечено у мужчин и при ПКРЛ. Аналогично $CD8^+$ -лимфоциты преобладали в тех же группах. Вместе с тем среди зрелых Т-клеток ($CD3^+$) преобладания $CD8^+$ -лимфоцитов в указанных группах не отмечено. При анализе НК-клеток ($CD16^+CD3^-$) достоверной связи с полом и гистологическим типом рака не выявлено.

Зрелые В-клетки КМ ($CD20^+CD45^{++}$) достоверно преобладали у женщин: $25,3 \pm 4,97$ % ($n = 7$) и $15,8 \pm 1,8$ % ($n = 26$), $p = 0,032$. В-лимфоциты также достоверно преобладали при аденокарциноме легкого в сравнении с ПКРЛ: $21,7 \pm 3,1$ % ($n = 17$) и $13,7 \pm 1,4$ % ($n = 16$), $p = 0,025$. С учетом взаимосвязи диагноза и пола в анализируемой группе больных мы провели сравнительный анализ уровней В-клеток в зависимости от пола при аденокарциноме. Различий по уровням $CD20^+$ -лимфоцитов не получено: у мужчин $19,2 \pm 3,9$ % ($n = 10$), у женщин $25,3 \pm 4,97$ % ($n = 7$), $p = 0,35$. Есть все основания считать более высокие уровни зрелых костномозговых В-лимфоцитов характерными для аденокарциномы легкого.

Таким образом, пол больных раком легкого и гистологический тип опухоли в анализируемой группе были взаимосвязаны: ПКРЛ был более типичен для мужчин, а аденокарцинома с равной частотой встречалась у мужчин и женщин. Для лиц мужского пола и при диагнозе ПКРЛ отмечено доминирование CD3⁺- и CD8⁺-клеток среди лимфоцитов КМ. В пределах зрелых Т-лимфоцитов таких взаимосвязей не отмечено. В-клетки КМ доминировали у женщин и при диагнозе аденокарциномы.

Ввиду важности эффекторных Т-клеточных популяций в реализации противоопухолевого эффекта мы изучили перфоринсодержащие лимфоциты, их связь с полом больных и гистологическим диагнозом. Это исследование проведено у 38 больных.

При исследовании перфоринсодержащих лимфоцитов КМ связи с полом нами не установлено (табл. 3).

В то же время имела место связь ряда иммунологических параметров с гистологическим диагнозом рака (табл. 4).

Достоверные различия заключались в преобладании CD4-лимфоцитов, положительных в отноше-

нии перфорина, и перфорин-положительных CD27⁺-лимфоцитов при аденокарциноме в сравнении с ПКРЛ.

Существование обеих этих субпопуляций хорошо известно, они являются минорными и малоизученными. Их обнаружение в КМ больных раком легкого и достоверная связь с гистологическим типом заболевания — это новый факт, заслуживающий несомненного внимания и более подробного изучения.

В последние годы отмечается большой интерес к исследованиям гемопоэза при опухолях. Мы проанализировали перфоринсодержащие клетки во взаимосвязи с показателями гемопоэза у больных раком легкого. Случаи разбавления КМ кровью были исключены на основании суммарного содержания клеток эритроидного ростка в КМ <5 %.

Корреляционные связи морфологически выявляемых клеточных типов КМ с перфоринсодержащими лимфоцитарными субпопуляциями представлены в табл. 5.

Как видно, миелоидные и эритроидные предшественники находятся в отрицательной корреляционной связи с перфорин-положительными клетками.

Таблица 3. Средние уровни перфорин-положительных лимфоцитов у мужчин и женщин, больных раком легкого

Table 3. Average levels of perforin-positive lymphocytes in men and women with lung cancer

Популяция лимфоцитов Lymphocytes population	Пол больных Patients' gender	n	Среднее Mean	Стандартная ошибка среднего Standard error of the meant	p
CD8 ⁺ -перфорин ⁺ CD8 ⁺ -perforin ⁺	Мужской Male	30	10,86	1,87	—
	Женский Female	8	9,04	3,94	0,67
CD45 ⁺ -перфорин ⁺ CD45 ⁺ -perforin ⁺	Мужской Male	30	21,26	3,06	—
	Женский Female	8	18,81	3,92	0,7
CD8-перфорин ⁺ CD8-perforin ⁺	Мужской Male	30	13,25	1,76	—
	Женский Female	8	14,36	4,10	0,78
CD4 ⁺ -перфорин ⁺ CD4 ⁺ -perforin ⁺	Мужской Male	30	6,98	2,02	—
	Женский Female	8	5,16	1,11	0,65
CD4-перфорин ⁺ CD4-perforin ⁺	Мужской Male	30	19,89	2,35	—
	Женский Female	8	15,68	4,53	0,42
CD27 ⁺ перфорин ⁺ CD27 ⁺ perforin ⁺	Мужской Male	30	1,59	0,39	—
	Женский Female	8	1,15	0,50	0,59

Таблица 4. Средние уровни перфорин-положительных лимфоцитов у больных аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого
Table 4. Average levels of perforin-positive lymphocytes in patients with adenocarcinoma and squamous cell lung cancer

Субпопуляция лимфоцитов Lymphocytes subpopulation	Гистология Histology	n	Среднее Mean	Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	p
CD8 ⁺ -перфорин ⁺ CD8 ⁺ -perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	10,04	1,75	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	10,83	2,72	0,82
CD45 ⁺ -перфорин ⁺ CD45 ⁺ -perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	18,23	2,30	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	22,77	4,20	0,38
CD8-перфорин ⁺ CD8-perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	12,19	1,20	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	14,53	2,77	0,48
CD4 ⁺ -перфорин ⁺ CD4 ⁺ -perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	2,19	0,46	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	10,16	2,66	0,008
CD4-перфорин ⁺ CD4-perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	20,02	2,48	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	18,18	3,22	0,67
CD27 ⁺ -перфорин ⁺ CD27 ⁺ -perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	0,78	0,15	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	2,09	0,56	0,033

Примечание. ПКРЛ — плоскоклеточный рак легкого.
Note. SCLC — squamous cell lung cancer.

Это не исключает регуляторного влияния соответствующих клеток с цитотоксическим потенциалом на ранние этапы дифференцировки эритроидных и миелоидных предшественников. Положительные корреляции имели место для перфоринсодержащих клеток со зрелыми нейтрофилами и уровнем лимфоцитов. Высокие уровни сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов обычно свидетельствуют о разбавлении КМ кровью, и в связи с этим можно было бы думать о том, что перфоринсодержащие лимфоциты попадают в КМ как примесь крови. Однако, как было отмечено, случаи разбавления КМ кровью были нами исключены из данного анализа.

Интересно, что обе минорные перфоринсодержащие субпопуляции, более высокие уровни которых наблюдались при аденокарциноме легкого (CD4, CD27), были взаимосвязаны с определенными показателями миелограммы.

Обсуждение

В данной работе мы рассмотрели как традиционные субпопуляции лимфоцитов — Т-клетки (CD3) и их

субпопуляции (CD4, CD8), зрелые В-лимфоциты (CD20), НК-клетки, так и ряд минорных, или эффекторных популяций (CD4⁺CD25⁺, CD27, перфорин⁺). Исследование впервые проведено в КМ больных раком легкого с параллельным детальным изучением миелограммы пациентов.

Уже на 1-м этапе обратили на себя внимание выраженные различия иммунологических профилей субпопуляционного состава лимфоцитов КМ больных ПКРЛ и аденокарциномой. Т-клеточные субпопуляции (CD3) и CD8-лимфоциты (Т- и НК-клетки) достоверно преобладали у больных ПКРЛ. А более высокие уровни зрелых В-лимфоцитов КМ были характерны для аденокарциномы. Вполне возможно, что принятие во внимание более характерного для той или иной гистологической формы рака варианта иммунного ответа (Т-, НК-клеточного или гуморального) позволит более направленно планировать таргетную и иммунотерапию у больных. Вместе с тем нельзя не отметить высокую ассоциацию пола больных с гистологическим вариантом опухоли — все 28 больных ПКРЛ были мужчины. С учетом того факта, что при

Таблица 5. Корреляционные связи перфоринсодержащих лимфоцитарных популяций костного мозга больных раком легкого с клетками гемопоэза

Table 5. Correlation of perforin-containing lymphocytic bone marrow populations of patients with lung cancer and hematopoietic cells

Клеточный тип и индекс миелограммы Cell type and myelogram index	CD45 ⁺ -перфорин ⁺ (n = 36) CD45 ⁺ -perforin ⁺ (n = 36)		CD8 ⁺ -перфорин ⁺ (n = 36) CD8 ⁺ -perforin ⁺ (n = 36)		CD4 ⁺ -перфорин ⁺ (n = 36) CD4 ⁺ -perforin ⁺ (n = 36)		CD27 ⁺ -перфорин ⁺ (n = 36) CD27 ⁺ -perforin ⁺ (n = 36)	
	R	p	R	p	R	p	R	p
Миелоциты Myelocytes	-0,340	0,042	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils	0,548	0,001	0,567	0,000	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Индекс созревания нейтрофилов Neutrophil maturation index	-0,363	0,029	-0,408	0,014	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Лимфоциты Lymphocytes	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	0,471	0,004	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Нормобласты базофильные Basophilic normoblasts	-0,397	0,017	-0,399	0,016	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Нормобласты полихроматофильные Polychromatophilic normoblasts	-0,701	0,000	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Сумма клеток эритроидного ростка Erythroid lineage cells count	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	0,349	0,037
Индекс созревания эритроидных клеток Erythroid maturation index	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	-0,33	0,05

Примечание. R – коэффициент корреляции; н. д. – нет достоверности.

Note. R – correlation coefficient; n. s. – not significant.

аденокарциноме легкого достоверных различий в уровнях CD3⁺ и CD8⁺ в зависимости от пола не выявлено, мы склонны связывать более высокие уровни эффекторных Т-клеток и CD8-клеток с гистологическим диагнозом ПКРЛ, а не с полом пациентов. Аналогично более высокие уровни зрелых В-клеток были характерными для аденокарциномы легкого. Иными словами, при исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов КМ мы впервые показали, что ПКРЛ характеризуется в большей степени Т- и НК-клеточными проявлениями иммунитета, а аденокарцинома – проявлениями гуморального иммунитета.

Дальнейший анализ полученных данных был посвящен эффекторным субпопуляциям, воздействие на которые может быть использовано для повышения эффективности противоопухолевого иммунитета. Эти перфоринсодержащие субпопуляции не имели связи с полом больных. Вместе с тем установлена достоверная связь с гистологическим вариантом опухоли. Минорные популяции цитотоксических CD4-лимфоцитов и CD27-лимфоциты, содержащие перфорин, были более выраженными при аденокарциноме легкого.

Таблица 6. Субпопуляции Т-клеток, экспрессирующие CD27 и эффекторные молекулы [5]

Table 6. Subpopulations of T-cells expressing CD27 and effector molecules [5]

Субпопуляция Т-клеток T-cells subpopulation	CD27	Гранзим А Granzim A		Гранзим В Granzim B	
		CD4	CD8	CD4	CD8
Tn	++	-	-	-	-
Tscm	+	-	-	-	-
Tcm	+	-	-/+	-	-
Ttm	+	-	++	-	+
Tem	-/+	-/+	+++	-/+	++
Tte	-	+	+++	-/+	+++

Примечание. Субпопуляции Т-клеток: Tn – naive, Tscm – стволовые клетки памяти, Tcm – клетки центральной памяти, Ttm – промежуточные клетки памяти, Tem – эффекторные клетки памяти, Tte – терминальные эффекторные клетки.

Note. T-cells subpopulations: Tn – naive; Tscm – memory stem cells; Tcm – central memory cells; Ttm – intermediate memory cells; Tem – effector memory cells; Tte – terminal effector cells.

CD4⁺-Т-клетки с цитотоксической активностью, как известно, выявляются при различных иммунных реакциях, играя важную роль в противовирусном и противоопухолевом иммунитете. Эти клетки характеризуются способностью секретировать гранзим В и перфорин и убивать клетки-мишени в контексте рестрикции класса HLA II. Считается, что эти клетки наиболее близки Th1 (Т-хелперы 1-го типа), секретирующим интерферон γ . Обнаружен подкласс наивных Т-клеток, способных дифференцироваться в CD4-цитотоксические Т-лимфоциты. CD4-цитотоксические Т-лимфоциты рассматриваются как потенциальные мишени для терапевтических целей [4].

Не менее интересен факт обнаружения достоверно более высоких показателей CD27-положительных клеток, экспрессирующих перфорин, при аденокарциноме легкого. Вероятнее всего, речь идет об эффекторных Т-клетках памяти, на которых коэкспрессия данных молекул (гранзим В, перфорин) возможна (табл. 6).

Взаимосвязь субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток КМ с миелокариоцитами представляет интерес как с точки зрения понимания

регуляции гемопоэза, так и с точки зрения особенностей, присущих различным опухолям. В ряде наших публикаций были отмечены особенности гемопоэза, связанные с накоплением оксифильных нормобластов, что являлось фактором, препятствующим развитию анемии при ряде лимфом [6–8]. Для определения оксифильных нормобластов нами был предложен проточно-цитометрический метод [9]. Особенности гемопоэза при меланоме были связаны с поражением КМ [10]. Более того, реципрокные взаимоотношения костномозговых НК-клеток с эритроидными предшественниками имели место при раке молочной железы [11].

Заключение

В статье изучены субпопуляции лимфоцитов КМ больных раком легкого (аденокарцинома, ПКРЛ). Установлено, что Т- и НК-клетки более характерны в количественном плане для ПКРЛ, а зрелые В-лимфоциты – для аденокарциномы. Эффекторные (перфорин-положительные) субпопуляции, такие как CD4⁺ и CD27⁺, также были достоверно более выражеными при аденокарциноме легкого. Установлена связь этих популяций с уровнем эритрокариоцитов КМ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Steven A., Fischer S.A., Robinson B.W. Immunotherapy for lung cancer. *Respirology* 2016;21:821–33. DOI: 10.1111/resp.12789.
- Buchan S.L., Anne Rogel A., Al-Shamkhani A. The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy. *Blood* 2018;131(1):39–48. DOI: 10.1182/blood-2017-07-741025.
- Buchan S., Manzo T., Flutter B. et al. OX40- and CD27-mediated costimulation synergizes with anti-PD-L1 blockade by forcing exhausted CD8⁺ T cells to exit quiescence. *J Immunol* 2015;194(1):125–33. DOI: 10.4049/jimmunol.1401644.
- Takeuchi A., Saito T. CD4 CTL a cytotoxic subset of CD4⁺ T-cells, their differentiation and function. *Front Immunol* 2017;8:194. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00194.
- Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F. et al. Who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013;43(11):2797–809. DOI: 10.1002/eji.201343751.
- Тупицын Н.Н., Зейналова П.А., Френкель М.А. и др. Роль костного мозга в прогнозе диффузной В-крупноклеточной лимфомы. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2015;4:40–7. [Tupitsyn N.N., Zeynalova P.A., Frenkel M.A. et al. The role of bone marrow in the prognosis of diffuse B-large cell lymphoma. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2015;4:40–7. (In Russ.)].
- Тупицын Н.Н., Фалалева Н.А., Моженкова А.В. и др. Роль костного мозга в прогнозе фолликулярной лимфомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(3):99–102. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-99-102. [Tupitsyn N.N., Falaleeva N.A., Mozhenkova A.V. et al. The role of bone marrow in the prognosis of follicular lymphoma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Biotherapeutic Journal 2016;15(3):99–102. (In Russ.)].
- Фалалева Н.А., Моженкова А.В., Османов Е.А. и др. Особенности эритропоэза больных фолликулярной лимфомой. *Вестник ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»* 2016;(3):35–8. [Falaleeva, N.A., Mozhenkova A.V., Osmanov E.A. et al. Features of erythropoiesis of patients with follicular lymphoma. *Vestnik FGBU "RONTs im. N.N. Blokhina"* = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center 2016;(3):35–8. (In Russ.)].
- Тупицын Н.Н., Чэн Ц., Зейналова П.А. Иммунофенотипическое изучение дифференцировки эритрокариоцитов костного мозга у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(4):52–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-52-57. [Tupitsyn N.N., Jiao C., Zeynalova P.A. Immunophenotypic study of bone marrow erythrocyte differentiation in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(4):52–7. (In Russ.)].
- Chernysheva O., Markina I., Demidov L. et al. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. *Cells* 2019;8(6):627. DOI: 10.3390/cells8060627.
- Tupitsyn N.N., Mkrtchan V.A., Palladina A.D. et al. Bone marrow lymphocyte populations of innate immunity in breast cancer patients. *GJMR* 2020;20(2):20–7. DOI: 10.34257/GJMRFVOL20IS2PG21.

Вклад авторов

Н.Н. Тупицын: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи, анализ полученных данных;

П.В. Кононец, А.К. Алахвердиев: анализ рукописи;

Т.М. Джуманазаров: обзор публикаций по теме исследования, оформление рукописи;

А.Д. Палладина: получение и анализ данных, обзор публикаций;

С.В. Чулкова: получение и анализ данных, подготовка рукописи, перевод.

Authors' contributions

N.N. Tupitsyn: developing the research design, writing the manuscript, analysis of the obtained data;

P.V. Kononets, A.K. Alakhverdiyev: manuscript analysis;

T.M. Dzhumanazarov: reviewing of publications of the article's theme, manuscript design;

A.D. Palladina: obtaining and analysis of data, review of publications;

S.V. Chulkova: obtaining and analysis of data, manuscript preparation, translation.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>

Н.Н. Тупицын / N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Т.М. Джуманазаров / T.M. Djumanazarov: <https://orcid.org/0000-0001-5029-1406>

А.К. Алахвердиев / A.K. Alakhverdiyev: <https://orcid.org/0000-0001-8378-2738>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 05.04.2020. Принята к публикации: 16.04.2020.

Article submitted: 05.04.2020. Accepted for publication: 16.04.2020.