

Ю. А. Шевченко¹, А. А. Христин¹, С. А. Фалалеева¹, В. В. Курилин¹, М. С. Кузнецова¹,
С. В. Сидоров², С. В. Сенников¹

Фенотипические и функциональные свойства дендритных клеток и содержание супрессорных клеточных популяций в периферической крови больных раком молочной железы

¹ ФГБНУ НИИФКИ;

² ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 1», г. Новосибирск

Прогрессирование или появление отдаленных метастазов при раке молочной железы (РМЖ) происходит под влиянием различных механизмов подавления противоопухолевого иммунного ответа. В данной работе проводилось изучение циркулирующих дендритных клеток (ДК) и супрессорных клеточных популяций в периферической крови больных раком молочной железы. Исследование фенотипических и функциональных свойств ДК было проведено в пробах интактной и TLR-стимулированной цельной крови больных раком молочной железы и условно-здоровых женщин с помощью многоцветной проточной цитометрии с использованием специфических маркеров. Для определения супрессорных популяций лимфоцитов клеток использовалась многоцветная панель, включающая маркеры CD4, CD25, CD127, FoxP3. Показано, что формирование вторичных очагов опухолевого роста у пациентов сопровождается нарушениями функциональной активности плазматоидных ДК и накоплением клеток с иммуносупрессорными функциями.

Ключевые слова: рак молочной железы, дендритные клетки, проточная цитометрия

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенной формой рака среди женщин. Прогрессирование или появление отдаленных метастазов происходит под влиянием различных механизмов подавления противоопухолевого иммунного ответа: изменение функциональной и дифференцировочной активности дендритных клеток (ДК) [1], секреции растворимых медиаторов и нарушения презентации антигенов, что меняет дифференцировку миелоидных клеток и лимфоцитов и приводит к формированию различных клеточных популяций с иммуносупрессивными свойствами [6,9]. В связи с этим, целью данной работы является изучение циркулирующих дендритных клеток (ДК) и супрессорных клеточных

популяций в периферической крови, выполняющих важную роль в регуляции механизмов иммунного ответа на опухоль-ассоциированные антигены в процессе прогрессирования рака молочной железы.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовалась венозная кровь 16 пациенток с первичным РМЖ (Mts-), 16 пациенток с прогрессирующим РМЖ (Mts+) в возрасте от 32 до 78 лет, а также условно-здоровых женщин без клинически и инструментально диагностированной патологии молочных желез (10 человек) после подписания информированного согласия. Венозную кровь у пациенток с первично выявленным РМЖ (Т 1-4 N 0-3 M 0-1) забирали перед применением первой линии неоадъювантной химиотерапии (по схеме AC или FAC) или операции (радикальной мастэктомии или радикальной резекции молочной железы). Пациентки с прогрессированием заболевания (верифицированные метастазы в кости, легкие, печень, надпочечники при отсутствии регионарных метастазов) получали лечение с применением антрациклинов и/или таксанов (в зависимости от ранее применявшегося лечения и текущей локализации метастазов). Максимальный период между предшествующим (комбинированным или комплексным) лечением и верификацией вторичных изменений составил 10 лет. С целью изучения фенотипических характеристик ДК периферической крови, потенциала созревания и миграционной активности, проводили исследование как интактных клеток, так и стимулированных для созревания агонистами TLR-4 (LPS) и TLR-7/8 (R 848 (Resiquimod)).

Определение популяций циркулирующих ДК проводилось методом многоцветной проточной цитометрии с использованием панели моноклональных антител: для миелоидных ДК (мДК) – CD45+/CD3-/CD19-/CD14-/BDCA-1 (CD 1c)+, для плазматоидных ДК (пДК) – CD 45+/CD3-/CD19-/CD14-/BDCA-2 (CD303)+. Характеристику фенотипа мДК и пДК оценивали по уровню экспрессии поверхностных маркеров HLA-DR, CD86, CD83, CCR7. Содержание Т-регуляторных клеток и супрессорных «хронических» CD4 Т-клеток в периферической крови больных РМЖ оценивали, применяя моноклональные антитела CD45, CD4, CD25, CD127 и FoxP3. Анализ клеточных популяций проводили с помощью проточного цитофлюориметра «BD FACSVers» и программного обеспечения «BD FACSuite». Результаты представлены в виде медианы и размаха квартилей, а для статистической обработки данных применялись критерии Манна-Уитни (между группами пациентов) и Уилкоксона (спонтанные/стимулированные пробы).

Результаты и обсуждение

Для оценки роли ДК в механизмах нарушений иммунной системы при РМЖ изучали свойства циркулирующих ДК с использованием высокоспецифичных маркеров CD 1c (BDCA-1) для миелоидных клеток и CD 303 (BDCA-2) для плазмцитоидных [11]. У пациентов с метастатическим РМЖ содержание мДК и пДК (от популяции CD 45+/CD3-/CD19-/CD14-лейкоцитов) составляет 1,6 и 0,8 % соответственно, что достоверно ниже по сравнению со здоровыми донорами (3,6 и 2,57% соответственно) и пациентами с первичным РМЖ (4,5 и 2,5% соответственно). Присутствие костимуляторных молекул на поверхности ДК имеет решающее значение в определении развития анергии или протективного ответа Т-клетками. Способность ДК реагировать на специфические стимуляторы созревания [2] экспрессией соответствующих маркеров позволяет оценить их миграционный потенциал и способность к созреванию.

У больных РМЖ повышено содержание HLA-DR+ мДК по сравнению со здоровыми донорами, а после стимуляции клеток цельной крови агонистами TLR снижается содержание HLA-DR+ мДК у больных с первичным РМЖ и содержание HLA-DR+ пДК у здоровых доноров. В стимулированных пробах цельной крови у больных с метастазирующим РМЖ содержание как миелоидных, так и плазмцитоидных ДК повышено по сравнению со здоровыми донорами, что характеризует и содержание CD 86-позитивных мДК у больных первичным РМЖ и CD 86-позитивных пДК у пациентов с метастазирующим РМЖ. После стимуляции клеток цельной крови агонистами TLR содержание CD 86-позитивных мДК не изменяется во всех исследуемых группах, а содержание пДК у здоровых доноров снижается и также остается минимальным по сравнению с больными РМЖ (рис. 1).

В качестве дополнительного параметра активации клеток использовали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), которая косвенно позволяет судить о количестве молекул на поверхности клеток. Показано, что при TLR-стимуляции достоверно возрастает MFI HLA-DR+ и CD 86+ миелоидных ДК во всех исследуемых группах, MFI HLA-DR+ пДК у здоровых доноров и CD 86+ пДК здоровых доноров. Плазмцитоидные HLA-DR+ ДК здоровых доноров отвечают на TLR-стимуляцию, в отличие от клеток больных РМЖ, при этом доля MFI стимулированных HLA-DR+ мДК достоверно выше по сравнению с HLA-DR+ пДК. Средняя интенсивность флуоресценции CD 86+ пДК у больных метастазирующим РМЖ достоверно выше по сравнению со здоровыми донорами.

Кроме того, показаны достоверные различия по средней интенсивности флуоресценции между миелоидными и плазмцитоидными ДК без стимуляции и между стимулированными миелоидными и плазмцитоидными ДК у пациентов с прогрессирующим РМЖ (рис. 2).

При исследовании относительного количества CD 83-позитивных клеток было показано, что клетки цельной крови без стимуляции практически не экспрессируют данный маркер (менее 1% позитивных клеток), а после TLR стимуляции количество CD 83-позитивных ДК резко возрастает и составляет (для миелоидных и плазмцитоидных ДК, соответственно): 85,75 и 58,6 % у здоровых доноров, 93,3 и 68,6 % у больных с первичным РМЖ и 92,6 и 93,2 % у больных с метастазирующим РМЖ (различия достоверны, $p < 0,05$). Поверхностный маркер CCR-7 необходим для миграции созревающих ДК в лимфоузлы и защиты зрелых ДК от апоптоза [10]. При исследовании содержания CCR-7-позитивных клеток показано, что данный маркер экспрессируется преимущественно на миелоидных ДК, причем, минимальное содержание CCR-7-позитивных клеток показано у больных с метастазирующим РМЖ. При TLR-стимуляции возрастает содержание CCR-7-позитивных мДК во всех исследуемых группах, а для пДК этот эффект наблюдается только у больных метастазирующим РМЖ (рис. 3).

Одним из основных механизмов прогрессирования является опухоль-индуцированная блокада дифференцировки миелоидных клеток в ДК, что приводит к появлению миелоидных супрессорных клеток, которые ингибируют врожденный и адаптивный иммунитет [7]. В настоящее время данную популяцию идентифицируют как HLA-DR-негативные CD 14+ клетки [4]. Нами показано, что максимальное количество миелоидных супрессоров присутствует у больных с метастазирующим РМЖ (табл. 1), а после TLR-стимуляции содержание этих клеток снижается и не отличается между исследуемыми группами (данные не представлены).

Клетки и микроокружение опухоли способны вызывать развитие регуляторных ДК с иммуносупрессивной функцией и подавление эффекторных популяций Т-клеток в пользу развития регуляторных клеток. Определение содержания Т-регуляторных клеток проводилось в популяции CD4+CD25+ активированных Т-лимфоцитов по наличию маркера FoxP3 и отсутствию поверхностного антигена CD 127 [5]. Содержание регуляторных FoxP3-позитивных клеток максимально у пациентов с метастазирующим РМЖ, а между больными первичным РМЖ и здоровыми донорами достоверных отличий не наблюдается (табл. 1). В условиях хронической

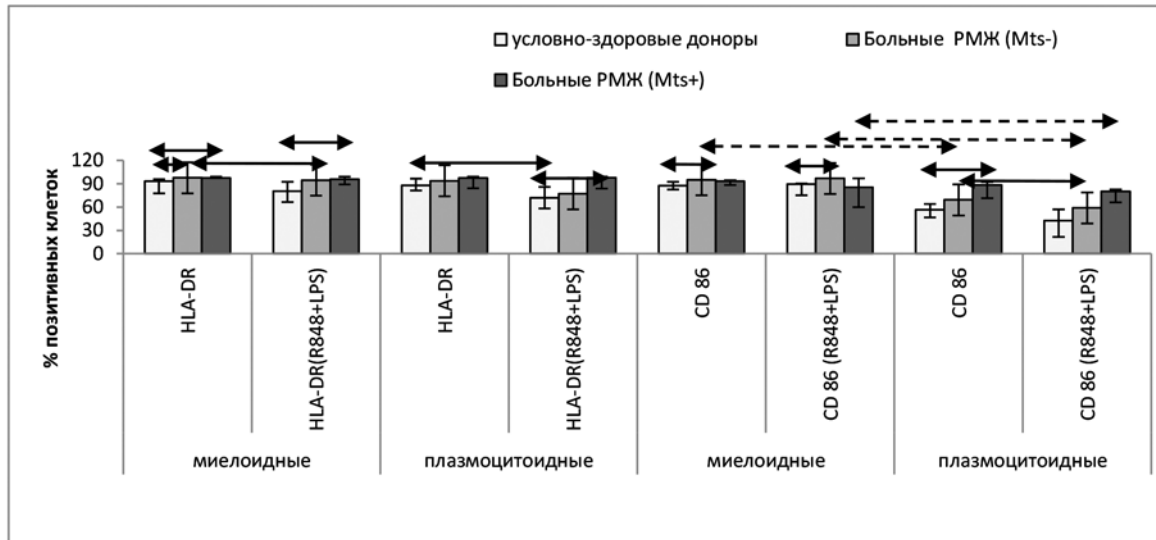


Рисунок 1. Относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих маркеры HLA-DR и CD86, в периферической крови больных метастазирующим РМЖ (n=16), первичным РМЖ (n=16) и условно-здоровых доноров (n=10). Стрелкой указано достоверное отличие ($p < 0,05$).

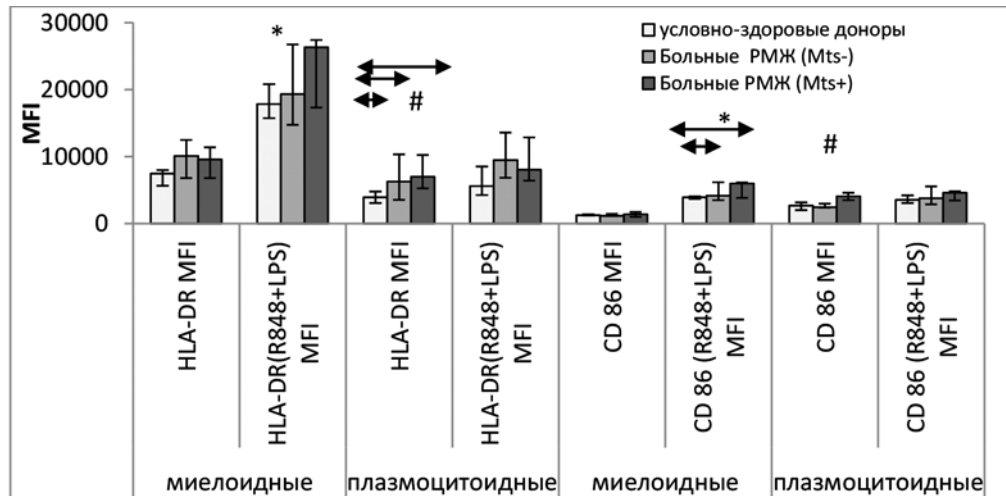


Рисунок 2. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих маркеры HLA-DR и CD86, в периферической крови больных метастазирующим РМЖ (n=16), первичным РМЖ (n=16) и условно-здоровых доноров (n=10). Стрелкой указано достоверное отличие ($p < 0,05$). Достоверные различия ($p < 0,05$): * – по сравнению с интактными клетками; # – по сравнению с миелоидными ДК (во всех исследуемых группах).

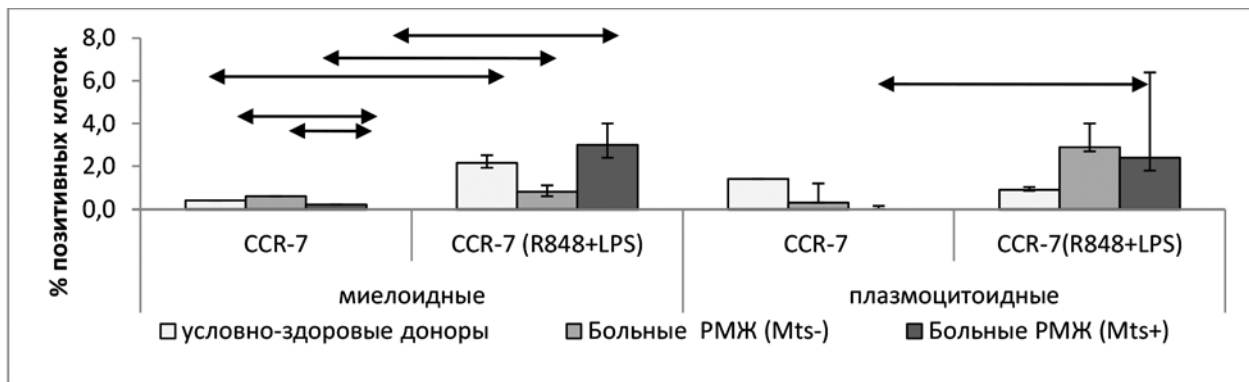


Рисунок 3. Относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих маркер CCR-7, в периферической крови больных метастазирующим РМЖ (n=16), первичным РМЖ (n=16) и условно-здоровых доноров (n=10). Стрелкой указано достоверное отличие ($p < 0,05$).

Таблица 1.

Относительное количество клеток (% позитивных клеток) с супрессорными функциями в периферической крови больных метастазирующим РМЖ (n=16), первичным РМЖ (n=16) и условно-здоровых доноров (n=10)

	Условно-здоровые доноры, (median, [UQ;LQ])	Пациенты с первичным РМЖ (Mts-), (median, [UQ;LQ])	Пациенты с метастазирующим РМЖ (Mts+), (median, [UQ;LQ])
Миелоидные супрессоры (CD 14+/HLA-DR-)	7,4 [4,975; 2,625]	22,7 [11,9; 7,6]*	47,85 [14,3; 10,4]*,#
Т-регуляторные клетки (CD 4+CD25+/FoxP3+/CD 127-)	5,75 [2,45; 1,975]	2,45 [6,35; 1,725]	12,2 [14; 4,2]*,#
«Хронические» CD 4+ клетки (CD 4+/CD25-/CD 127-)	3 [0,525; 0,7]	8,1 [2,025; 0,975]*	13,2 [5,8; 2]*,#

Достоверные различия (p<0,05):

* – по сравнению со здоровыми донорами;

– по сравнению с пациентами с первичным РМЖ

антигенной стимуляции (опухоль или инфекционный агент) может происходить появление так называемых «хронических» CD4+ клеток, которые авторами идентифицированы как CD4+CD127–CD25– лимфоциты. Такая популяция клеток секретирует следовые количества IL-17, IL-10 и значительные количества FASL и гранзима В [8]. По нашим данным, максимальное содержание таких клеток обнаружено у пациентов с метастазирующим РМЖ в сравнении с пациентами с первичным РМЖ и здоровыми донорами (табл. 1).

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод о том, что при раке молочной железы показано достоверное снижение содержания циркулирующих дендритных клеток, что особенно выражено у пациентов с наличием отдаленных метастазов. При использовании маркеров CD1c и CD303 для идентификации циркулирующих ДК, исследуемые ДК являются незрелыми, но способны к переходу в зрелое функционально-активное состояние при специфической TLR-стимуляции. При этом для костимуляторных молекул CD86 и HLA-DR на миелоидных ДК происходит увеличение количества молекул на клетке, а для CD83 и CCR-7 – увеличение количества позитивных клеток. Плазмцитоподобные ДК больных метастазирующим раком молочной железы при комплексной TLR-стимуляции хоть и становятся зрелыми, но сохраняют исходный уровень костимуляторных молекул, что позволяет предположить накопление зрелых плазмцитоподобных ДК с нарушенной функциональной активностью у таких пациентов. Содержание миелоидных супрессоров и Т-лимфоцитов с супрессорными свойствами также повышено у больных раком молочной железы, особенно у пациентов с метастазирующими формами. Таким образом, формирование вторичных очагов опухолевого роста у пациентов, ранее перенесших комбинированное и комплексное лечение РМЖ, сопровождается более глубокими нарушениями функциональной активности плазмцитоподобных ДК и накоплением клеток

с иммуносупрессорными функциями, которые потенциально являются перспективными клетками-мишенями для таргетной иммунотерапии.

Работа поддержана грантом Президента РФ № 14. 120. 14. 161-МК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сенников С. В., Облеухова И. А., Курилин В. В. и др. Особенности функциональной активности дендритных клеток при опухолевом росте // *Вопр. онкол.* – 2015. – Т. 61. №. 4. – С. 556-562.
2. Della Bella S, Giannelli S, Taddeo A. et al. Application of six-color flow cytometry for the assessment of dendritic cell responses in whole blood assays // *J Immunol Methods.* – 2008. – Vol. 339. № 2. – P. 153-164.
3. Hargadon KM. Tumor-altered dendritic cell function: implications for anti-tumor immunity // *Front Immunol.* – 2013. – № 4. – P. 192.
4. Huang A, Zhang B, Wang B et al. Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients // *Cancer Immunol Immunother.* – 2013. – Vol. 62. № 9. – P. 1439-1451.
5. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells // *J Exp Med.* – 2006. – Vol. 203. № 7. – P. 1701-1711.
6. Ma Y, Shurin GV, Peiyuan Z, Shurin MR. Dendritic cells in the cancer microenvironment // *J Cancer.* – 2013. – Vol. 4. № 1. – P. 36-44.
7. Markowitz J, Wesolowski R, Papenfuss T. et al. Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer // *Breast Cancer Res Treat.* – 2013. – Vol. 140. № 1. – P. 13-21.
8. Péguillet I, Milder M, Louis D. et al. High numbers of differentiated effector CD4 T cells are found in patients with cancer and correlate with clinical response after neoadjuvant therapy of breast cancer // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74. № 8. – P. 2204-2216.
9. Pinzon-Charry A, Maxwell T, McGuckin MA. et al. Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2006. – Vol. 8. № 1: R5.
10. Sánchez-Sánchez N, Riol-Blanco L, Rodríguez-Fernández JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 176. № 9. – P. 5153-5159.

11. Van Brussel I, Van Vré EA, De Meyer GR. Et al. Expression of dendritic cell markers CD11c/BDCA-1 and CD123/BDCA-2 in coronary artery disease upon activation in whole blood // J Immunol Methods. – 2010. – Vol. 362. № 1-2. – P. 168-175.

Поступила в редакцию 17. 07. 2016

*Yu. A. Shevchenko¹, A. A. Khristin¹, S. A. Falaleeva¹,
V. V. Kurilin¹, M. S. Kuznetsova¹, S. V. Sidorov², S. V.
Sennikov¹*

Phenotypic and functional characteristics of dendritic cells and contents of suppressor cell populations in peripheral blood of breast cancer patients

¹Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology

²City Clinical Hospital № 1
Novosibirsk

The progression or the appearance of distant metastases in breast cancer (BC) is influenced by a variety of antitumor immune response suppression mechanisms. In this paper we study circulating dendritic cells (DC) and the suppressor cell populations in peripheral blood of breast cancer patients. The study of phenotypic and functional properties of DCs was performed in the samples of intact and TLR-stimulated whole blood from breast cancer patients and healthy women by multicolor flow cytometry. To determine the suppressor cell population among lymphocytes multicolor panel comprising markers CD 4, CD 25, CD 127, FoxP3 was used. It is showed that the formation of secondary foci of tumor growth in patients was accompanied by disturbances of the functional activity plasmacytoid DC and accumulation of cells with immunosuppressive functions.

Key words: breast cancer, dendritic cell, flow cytometry