

На правах рукописи

ДЖУМАНАЗАРОВ ТЕМИРБЕК МАТЧАНОВИЧ

**ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОСТНОГО
МОЗГА У БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**

14.01.12 – Онкология

АФТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович)

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Аллахвердиев Ариф Керимович

доктор медицинских наук, профессор

Тупицын Николай Николаевич

Официальные оппоненты:

Полоцкий Борис Евсеевич, доктор медицинских наук, профессор, заместитель главного врача по онкологии клинической больницы 1 Акционерного общества «Группа компаний МЕДСИ».

Гривцова Людмила Юрьевна, доктор биологических наук, заведующая отделом лабораторной медицины и лабораторией клинической иммунологии Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «18» марта 2021 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д.23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан « » 202_ года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рак легкого является одним из наиболее частых онкологических заболеваний во всем мире, ежегодно регистрируется более 2 млн. новых случаев рака легкого. Высокая заболеваемость отмечается как в странах Европы, США, так и в России (American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2018, I. Sekine et al. 2018). Каждый год по всему миру от рака легкого умирает 1,59 миллиона человек. По данным А.Д. Каприна в России рак легкого занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости у мужчин (16,9%) и девятое место у женщин (4,0%). В 2018 году от рака легкого умерло 50774 человек (А.Д. Каприн, В.В. Старинский, 2019).

Долгие годы в лечении больных НМРЛ хирургическое вмешательство являлось единственно возможным и самостоятельным методом. На сегодняшний день подходы к терапии НМРЛ довольно разнообразны, что обусловлено рядом новейших разработок и их возможностью применения у данной категории больных. Объем хирургического лечения может варьировать от выполнения лобэктомии до пневмонэктомии, при этом обязательным компонентом операции является медиастинальная лимфодиссекция (К.И. Колбанов и др. 2014). Широко распространено мнение, что при малых размерах опухоли возможно провести радикальное лечение, однако при НМРЛ это не так. При I-II стадии опухолевого процесса радикальную операцию возможно выполнить у 20% больных (L.T. Tanoue et al. 2009, V.G. Pishchik et.al. 2015, R.G. Downey et al. 2007). После радикальных вмешательств может проводиться химиотерапия в адъювантном режиме, поскольку это позволяет улучшить 5-летнюю общую выживаемость и выживаемость без прогрессирования.

Неoadъювантные режимы лекарственной терапии при локализованном и местно-распространенном НМРЛ, исследуемые в последнее время, могут помочь девитализации опухолевых клеток перед хирургическим вмешательством; оказать воздействие на субклинические (микрочастичные) очаги, располагающиеся как в лимфатических узлах, так и в отдаленных органах, включая костный мозг

(КМ) (VW. Rusch et al. 2018, T. Cascone et al. 2019, P.M. Forde et al. 2018). По данным исследований SieneI W. установлено, что наличие микрометастазов (диссеминированных опухолевых клеток - ДОК) в КМ больных НМРЛ коррелирует с неблагоприятным прогнозом (W. SieneI et al. 2007). Вместе с тем установлена взаимосвязь ДОК с клинико-морфологическими характеристиками НМРЛ: размером первичной опухоли, степенью дифференцировки, статусом лимфатических узлов (K. Pantel et al. 1993, K. Yasumoto et al. 2003).

Известно, что популяции ДОК отводят ведущую роль в процессах самоподдержания и метастазирования злокачественных опухолей. Особый фенотип ДОК сопряжен с их состоянием покоя, которое обуславливает их устойчивость к системной терапии и длительную персистенцию в КМ онкологического больного (WJ Allard et al. 2004, M. Balic et al. 2006). Это дает основания для более детального изучения микрометастатических очагов НМРЛ в КМ и их микроокружения. От решения этого вопроса зависит выбор адекватного лечения больного и положительный исход заболевания.

Сообщается о прогностическом значении популяции CD8⁺ CD28⁺Т-клеток и CD8⁺CD28⁻ Т-клеток у больных НМРЛ (С. Liu et al. 2019, С. Liu et al. 2019), увеличении содержания популяции CD4⁺CD25⁺ у больных раком легкого (B. Karagoz et al. 2010).

Важным разделом, приобретающим особое значение, становится изучение гемопоэза при злокачественных опухолях. Литературы по этой теме встречается немного. Ей посвящены единичные исследования, обнаруживающие существование взаимосвязей между гемопоэзом и развитием опухоли, в которых отмечены ряд особенностей эритропоэза, гранулоцитопоэза и проведены параллели с наличием ДОК в КМ (О.В. Крохина 2003, В.А. Мкртчян и др. 2019, Е.Г. Тимонина и др. 2016, Н.Н. Тупицын 2018).

Таким образом, на сегодняшний день актуально проведение более глубокого и детального изучения биологии НМРЛ: изучения микрометастатических очагов (диссеминированных опухолевых клеток), микроокружения опухоли, иммунологических факторов организма больного,

включая популяционный состав лимфоцитов КМ и особенностей гемопоэза при НМРЛ, что может дать ответы на назревшие вопросы.

Цель исследования

Изучить диссеминированные опухолевые клетки и субпопуляционный состав лимфоцитов в костном мозге больных немелкоклеточным раком легкого, оценить их взаимосвязь с показателями гемопоэза и степенью распространенности опухолевого процесса.

Задачи исследования

1. Определить частоту обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от степени распространенности опухолевого процесса.

2. Изучить состав иммунокомпетентных клеток костного мозга больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от морфологического типа опухоли.

3. Охарактеризовать показатели кроветворения больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от наличия диссеминированных опухолевых клеток.

4. Провести анализ клинико-морфологических параметров в зависимости от поражения костного мозга больных при различных стадиях немелкоклеточного рака легкого.

5. Изучить взаимосвязь субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга с показателями гемопоэза у больных немелкоклеточным раком легкого.

6. Охарактеризовать особенности состава эффекторных звеньев иммунокомпетентных клеток костного мозга при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого.

Методы и методология исследования

Диссертационная работа выполнена на основании анализа данных больных немелкоклеточным раком лёгкого, которые прошли обследование и получили

лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2018 по 2019 гг. В соответствии с поставленными задачами были сформированы критерии, по которым производилось включение больного в исследование: верифицированный диагноз немелкоклеточного рака лёгкого, отсутствие предшествующего лечения, отсутствие противопоказаний к стеральной пункции для забора костного мозга. Работа выполнена совместно с онкологическим отделением хирургических методов лечения №11 (торакальной онкологии) и лабораторией иммунологии гемопоэза НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

При обработке клинического материала учитывались возраст, пол, первичная локализация опухоли, наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах, наличие отдаленных метастазов, характер и объем хирургического вмешательства, гистологический тип немелкоклеточного рака лёгкого, степень дифференцировки опухоли. Все показатели учитывались с целью последующего анализа взаимосвязи с иммунологическими данными исследования.

Морфологическое исследование костного мозга выполнялось согласно стандартному протоколу, включающему окрашивание препарата с последующим подсчетом миелограммы и расчетом индексов миелограммы, а также обязательной оценкой наличия диссеминированных опухолевых клеток в исследуемом образце костного мозга, представленном в количестве не менее 6 стекол.

Иммунологическое исследование костного мозга проводилось методом многопараметровой проточной цитометрии, позволяющей проводить анализ большого числа событий с высокой скоростью. Этот метод основан на регистрации сигналов светорассеяния и флуоресценции от клеток, проходящих в ламинарном потоке жидкости под прицелом лазерного луча. Использование одновременно нескольких флуоресцентных меток позволяет проводить анализ до 8 маркеров включительно, что и было применено в данном исследовании.

Оцениваются как поверхностные, так и внутриклеточные антигены. Обработка полученных в ходе сбора клеток цитометрических данных проводится в программе FCS express v.3, Kaluza Analysis v2.1. Современная программа Kaluza обеспечивает объединение нескольких цитометрических файлов в один, что предоставляет возможность одномоментного анализа большого числа событий (10 – 100 млн), которое требуется при изучении нефракционированного костного мозга.

Для проведения статистического анализа использовалось программное обеспечение SPSS, v. 21. В процессе обработки данных, во-первых, производилось выявление отличий анализируемых показателей и их взаимосвязей в проверяемых выборках. Во-вторых, определяли наличие и величину связи (или зависимости) одного или нескольких анализируемых параметров с другими показателями. Для этого использовали различные статистические методы, учитывая границы применимости каждого из выбираемых способов обработки имеющихся данных исследования. В случае невозможности применения параметрических методов анализа для переменных непрерывного типа, а также при малых объемах выборок, использовались непараметрические методы (например, критерий Манна-Уитни). При нормальном распределении оценка различий между количественными показателями проводилась с использованием Т-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для сравнения качественных показателей применяли точный критерий Фишера и χ^2 . Методом вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена и проверки его значимости определяли величину ранговой взаимосвязи порядковых/количественных показателей. Определение силы линейной связи двух количественных показателей осуществляли методом вычисления коэффициента корреляции Пирсона с проверкой его значимости.

Научная новизна

Впервые в России проведено изучение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге, субпопуляций костномозговых лимфоцитов, изучение гемопоэза у больных немелкоклеточным раком лёгкого.

Установлено, что наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге достоверно коррелирует с высокой степенью дифференцировки НМРЛ. Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток при аденокарциноме была несколько выше, чем при плоскоклеточном раке. Впервые показано, что субпопуляционный состав клеток костного мозга имеет взаимосвязь с гистологическим вариантом НМРЛ:

- плоскоклеточный рак легкого характеризовался более высоким содержанием костномозговых зрелых Т-клеток (CD3) и CD8-лимфоцитов (Т- и НК-клетки).

- для аденокарциномы была типичной В-клеточная реакция (CD20+CD45++).

Впервые установлено, что эффекторные (перфорин-содержащие) популяции лимфоцитов костного мозга имели связь с гистологическим вариантом НМРЛ:

- для аденокарциномы было характерно наличие CD4-позитивных цитотоксических лимфоцитов и экспрессия на эффекторах CD27.

Впервые установлено, что эффекторные перфорин-содержащие (CD8+Перфорин+, CD4+Перфорин+, CD27+Перфорин+) популяции лимфоцитов костного мозга при НМРЛ находятся в отрицательной корреляционной связи с миелоидными и эритроидными предшественниками.

Теоретическая и практическая значимость

Определение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге позволяет более точно оценивать степень распространенности опухолевого процесса у больных НМРЛ, выявляя ранний процесс гематогенной диссеминации опухоли. Это может служить основанием для рассмотрения вопроса о дополнительном лекарственном лечении у этой категории больных. Выявленная связь эффекторных субпопуляций лимфоцитов костного мозга (CD27+перфорин+) с гистологическим вариантом рака лёгкого позволяет выделить группу потенциальных кандидатов для иммунотерапии агонистами CD27.

Учитывая полученные результаты в отношении лимфоцитарных популяций костного мозга, целесообразно принять во внимание, что для разных

гистологических форм характерны разные варианты иммунного ответа (Т-, НК-клеточного или гуморального). Это поможет более направленно планировать таргетную и иммунотерапию у больных НМРЛ, выбирая препараты, влияющие на гуморальное или клеточное звено противоопухолевого ответа.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в постановке целей и задач настоящего исследования, лечебном процессе проспективного исследования 68 больных немелкоклеточным раком лёгкого, вошедших в исследование. Автор участвовал в процессе, анализе иммунологических показателей больных, включенных в диссертационную работу. Автором самостоятельно проведён анализ отечественной и зарубежной литературы, посвящённый изучаемой в представленной работе проблеме, статистическая обработка и интерпретация данных, сформулированы выводы и оформлена диссертационная работа.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («медицинские науки»), области исследования п.2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)»

Положения, выносимые на защиту

Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных НМРЛ возможно методом многопараметровой проточной цитометрии. Комбинация маркеров CD45, EpCAM / KL-1 позволяет выявить в костном мозге больных НМРЛ диссеминированные опухолевые клетки с частотой 43,5% (при пороговом значении 1 клетка на 10 млн. миелокариоцитов (1×10^{-7}). При этом у большинства больных отсутствовали макрометастазы, определяемые стандартными методами обследования.

Выявление диссеминированных опухолевых клеток на ранних стадиях НМРЛ свидетельствует о ранней гематогенной диссеминации опухоли.

Наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных НМРЛ не коррелирует с полом, возрастом, размером первичной опухоли, статусом лимфоузлов, стадией, морфологическим видом НМРЛ. Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных НМРЛ имеет связь со степенью дифференцировки опухоли. При высокодифференцированном НМРЛ отмечается более частое поражение костного мозга. Выявление диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных НМРЛ чаще наблюдается при нормальных показателях гранулоцитопоеза.

Субпопуляционный состав клеток костного мозга имеет взаимосвязь с гистологическим вариантом НМРЛ, что отражает разный характер противоопухолевого иммунного ответа. Высокое содержание зрелых Т-лимфоцитов (CD3, CD8) отмечается при плоскоклеточном типе НМРЛ. Повышенное содержание зрелых В-клеток более характерно для аденокарциномы.

Гистологические типы НМРЛ отличаются по уровню костномозговых перфорин-содержащих популяций лимфоцитов. Повышенное содержание CD4 цитотоксических лимфоцитов, CD27- экспрессирующих лимфоцитов наблюдаются при аденокарциноме. Отдельные эффекторные перфорин-содержащие (CD8+Перфорин+, CD4+Перфорин+, CD27+Перфорин+) популяции лимфоцитов костного мозга при НМРЛ взаимосвязаны с показателями гемопоэза. Их отрицательная корреляция наблюдается с миелоидными и эритроидными предшественниками. Нарастание цитотоксического потенциала костномозговых перфорин-содержащих лимфоцитов сопровождается снижением содержания клеток эритроидного ростка костного мозга.

Необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение эффекторных перфорин-содержащих субпопуляций лимфоцитов при НМРЛ, воздействие на которые может использоваться для повышения эффективности противоопухолевого иммунитета.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в практику онкологического отделения хирургических методов лечения №11 (торакальной онкологии) и лаборатории

иммунологии гемопоза отдела клинико-лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 22 сентября 2020 года на совместной научной конференции онкологического отделения хирургических методов лечения №11 (торакальной онкологии), онкологического отделения лекарственных методов лечения №17 (химиотерапевтического), лаборатории иммунологии гемопоза, лаборатории клинической иммунологии НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова; лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Объём и структура диссертации

Диссертация построена по традиционному стилю и состоит из введения, четырёх глав, включающих литературный обзор, материалы и методы, результаты исследования, а также обсуждение и заключение, выводы и список литературы, содержащий 188 источника, из них 158 зарубежных авторов. Работа представлена на 136 страницах машинописного текста, иллюстрирована 39 таблицами и 19 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы

В настоящее исследование включено 68 больных НМРЛ, получивших хирургическое лечение в онкологическом отделении хирургических методов лечения №11 (торакальной онкологии) НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ. Сроки проведения исследования составили 2 года: с 2018 по 2019 гг.

Среди всех пациентов мужчин было 52 (76,5%), женщин -16 (23,5%). Средний возраст которых составил: 63,3 и 62,4 года соответственно.

По результатам обследования у 28 (41,2%) больных диагностирован центральный рак легкого, в 40 (58,8%) наблюдениях - периферический (Таблица 1).

Таблица 1 – Распределение больных НМРЛ в зависимости от клинко-анатомической формы

Клинко-анатомический вид НМРЛ	Количество больных, %	
Центральный	41,2 (n=28)	
	Мужчины 96,2 (n=27)	Женщины 3,8 (n=1)
Периферический	58,8 (n=40)	
	Мужчины 64,3 (n=25)	Женщины 35,7 (n=15)
Всего	100,0 (n=68)	

Локализация первичной опухоли в левом легком наблюдалась у 31 (45%) больного, в правом легком опухоль располагалась в 37 случаев (55%) (Рисунок 1).

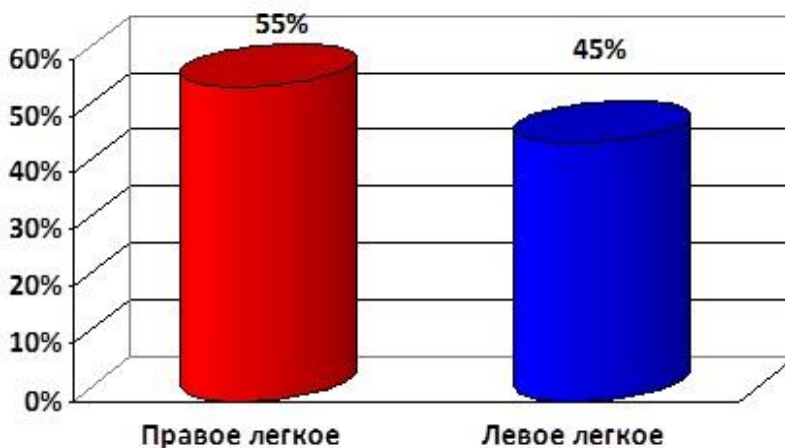


Рисунок 1 – Распределение больных НМРЛ в зависимости от пораженного легкого

Всем больным было выполнено хирургическое вмешательство разного объема: лобэктомия – 60,3%, билобэктомия - 11,8%, пневмонэктомия - 16,2%,

сегментэктомия – 2,8%, в 7,4% (n=5) случаев операция носила диагностический характер и ограничивалась биопсией (лимфатических узлов, плевры), а в 1 случае – паратрахеальной лимфодиссекцией.

Больные распределены по стадиям опухолевого процесса в соответствии с международной классификацией TNM (7 пересмотра) (Таблица 2). Следует отметить, что в исследовании преобладали больные со стадиями IB (22,0%), IIА (19,1%), IIIА (20,6%).

Таблица 2 – Распределение больных НМРЛ по стадиям опухолевого процесса

Стадия заболевания	Относительное количество больных (%)	Абсолютное количество больных
I А	11,8	8
I В	22,0	15
II А	19,1	13
II В	11,8	8
III А	20,6	14
III В	5,9	4
IV	8,8	6
Всего	100,0	68

Отдаленные метастазы (M1) выявлены у 6 больных (8,8%). Из них у 2 (33,4%) больных имелись метастазы опухоли по плевре. Метастаз в контрлатеральное легкое выявлен также у 2 пациентов. В одном случае отмечено метастатическое поражение головного мозга и грудного позвонка, и в одном случае - метастаз в надпочечник.

В зависимости от гистологического подтипа больные НМРЛ распределились следующим образом. В 38 (55,8%) случаях установлена аденокарцинома лёгкого, в 28 (41,2%) случаях выявлен плоскоклеточный рак лёгкого и в 2 (3%) наблюдениях опухоль имела смешанный характер строения (Таблица 3).

Таблица 3 – Распределение больных НМРЛ в зависимости от гистологического типа

Гистологический вид	Абсолютное количество больных	Относительное количество больных (%)
Плоскоклеточный	28	41,2
Аденокарцинома	38	55,8
другие виды	2	3,0
Всего	68	100,0

Дифференцировка (G) опухоли, установленная по результатам патоморфологического исследования, установила, что в исследовании преобладали больные с умеренно-дифференцированными опухолями (G2) (50%, n=34). Высокодифференцированная форма (G1) НМРЛ наблюдалась у 7,4% (n=5) больных, в то время как низкая степень дифференцировки (G3) отмечена в 32,4% (n=22) случаях. В 7 (10,2%) случаях дифференцировка опухоли не определялась.

Метастатическое поражение лимфатических узлов наблюдалось у 35 больных. Из них поражение ипсилатеральных перибронхиальных и/или пульмональных лимфатических узлов корня лёгкого (включая их вовлечение путём непосредственного распространения самой опухоли) (N1) было установлено у 30,9% (n=21) больного. В 17,6% (n=12) случаях отмечено метастатическое поражение ипсилатеральных медиастинальных лимфатических узлов (N2). У 2,9% (n=2) больных установлена стадия N3. В 47,1% (n=32) случаях лимфатические узлы по данным гистологического исследования были интактны (N0). В 1 случае индекс N не был установлен (Nx) – 1,5%.

Костный мозг был получен путем стерильной пункции во время хирургического вмешательства. Исследования КМ проведены в лаборатории иммунологии гемопоза клинико-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В работе были использованы морфологический и иммунологический методы. Морфологический метод включал в себя: подсчет миелограмм, поиск опухолевых клеток в костном мозге. Иммунологическое исследование костного мозга выполнено с использованием

многопараметровой проточной цитометрии в 8-цветной панели антител (Таблица 4).

Таблица 4 – Панель антител использованная в работе для иммунофенотипирования КМ

№	V450	V500	FITC	PE	PC5	PC7	APC	APC-H7
1	CD45		KL-1	EpCam				
2	CD45		CD20	CD8	CD27	CD2	CD5	CD3
3	CD4	CD45	Perforin	Granzyme	CD27	HLA-DR	CD3	CD8
4	CD4	CD45	CD7	CD25	CD27	TCRg/d	CD3	CD8

В работе определялись диссеминированные опухолевые клетки: CD45-EPCAM+(KL-1+). Популяции костномозговых Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток изучены на основании экспрессии следующих антигенов: CD3, CD2, CD4, CD8, CD19, CD20, CD16, CD56, CD27, CD25.

Диссеминированные опухолевые клетки выявлялись по отсутствию экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в сочетании с экспрессией EPСAM или KL-1. Анализировались 20 млн миелокариоцитов (или все клетки образца), при этом положительными считались случаи при обнаружении не менее 1 клетки на 10 млн миелокариоцитов.

Субпопуляционный состав костного мозга изучался в гейте зрелых лимфоцитов, на основании выраженной экспрессии CD45 в сочетании с низкими характеристиками бокового светорассеяния (SSC). Сбор осуществлялся на 100 тыс. клеток. На рисунке 8, приведен пример выделения фракции лимфоцитов в характеристиках SSC и последующей оценки субпопуляции CD3+ Т-клеток.

Статистический анализ полученных результатов

Для проведения статистического анализа полученных результатов работы был разработан специальный кодификатор и внесены в «базу данных», созданную на основе электронных таблиц EXCEL v. 2010 г. Все полученные результаты

касающиеся 68 больных НМРЛ были обработаны при помощи программы SPSS, v. 21.

Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию t Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для установления связи между двумя дискретными величинами, в зависимости от их типа и получаемых таблиц сопряженности использовали точный критерий Фишера и χ^2 по Пирсону, различия считали значимыми при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили по Пирсону или Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссеминированные опухолевые клетки в костном мозге у больных НМРЛ и их взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками опухоли

Изучение диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в костном мозге (КМ) больных НМРЛ выполнялось в несколько этапов. Первым этапом в работе проводилось морфологическое изучение КМ: подсчет миелограммы и поиск опухолевых клеток. Морфологически ДОК в КМ выявлены только в 1 из 62 случаев. Следующим этапом выполняли иммунологическую оценку методом проточной цитометрии. Для установления наличия ДОК в КМ нами был задан пороговый уровень значений: 1 опухолевая клетка на 10 млн. миелокариоцитов. С учетом заданного порогового значения на основании яркой экспрессии EPCAM и отсутствия экспрессии CD45 в КМ больных НМРЛ выявлены ДОК (CD45-EPCAM+) в 43,5 % случаев ($n=27$) (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Частота выявления ДОК в КМ больных НМРЛ (методом проточной цитометрии)

Одна эпителиальная (опухолевая) клетка среди 10 млн. миелокариоцитов в образцах КМ выявлена у 9 (14,5%) больных. В остальных случаях количество опухолевых клеток, определяемых иммуноцитологически, варьировало от 2 до 242. У 2 (3,2%) из 62 больных НМРЛ обнаружено скопление опухолевых клеток. Морфологически ДОК в КМ у данных больных не обнаружены. Сразу отметим, что по результатам проведенного анализа, количество выявленных опухолевых клеток в КМ больных НМРЛ не зависело от стадии. Например, малое количество клеток (не более 5) обнаружено как при наличии метастазов в отдаленные органы (M1), так и на более ранних стадиях. В целом число ДОК в образцах КМ было низким: у большинства больных НМРЛ не превышало 5 клеток на 10 млн. Максимальное количество ДОК (242 клетки) в КМ наблюдалось у больного со IIА стадией (T2aN1M0) плоскоклеточного рака легкого.

Следует отметить, что ДОК обнаруживались на всех стадиях опухолевого процесса: IA – 60%, IB – 35,8%, IIА – 58,3%, IIВ – 44,5%, IIIа – 30,8%, IIIВ – 25,0%, IV – 50,0%. Но достоверной связи со стадией не установлено. Также не обнаружено связи ДОК с полом, возрастом пациентов, гистологическим диагнозом НМРЛ, размерами опухоли (Т), наличием метастазов в лимфатических узлах.

Нами также проведен анализ частоты поражения КМ в зависимости от степени дифференцировки опухоли, по результатам которого установлена достоверная связь ($p=0,023$) с данным признаком (Таблица 5).

Таблица 5 – Частота выявления ДОК в зависимости от степени дифференцировки опухоли

Степень дифференцировки опухоли		ДОК		Всего
		отсутствуют	присутствуют	
Низкая G3	Частота	12 (60,0%)	8 (40%)	20 (100,0%)
Умеренная G2	Частота	20 (64,5%)	11(35,5%)	31(100,0%)
Высокая G1	Частота	0 (0,0%)	4 (100,0%)	4 (100,0%)
Всего	Частота	32 (60,4%)	23 (39,6%)	55 (100,0%)
$p=0,023$				

В литературе встречаются публикации по результатам научных исследований, сообщающие об особенностях гранулоцито – и эритропоза у онкологических больных. Мы провели изучение показателей миелограмм у всех больных НМРЛ и установили, что некоторые параметры были связаны с клинко-морфологическими характеристиками опухоли. Следует отметить, что в начале анализа были исключены случаи разбавления КМ кровью на основании суммарного содержания клеток эритроидного ростка в КМ менее 5%.

Также отмечено, что индекс созревания нейтрофилов был связан со стадией опухолевого процесса (Таблица 6). Как видно из таблицы, снижение данного показателя чаще наблюдалось при II стадии НМРЛ – 89,5%.

Таблица 6 – Взаимосвязь индекса созревания нейтрофилов больных НМРЛ со стадией опухолевого процесса

Стадия	Индекс созревания нейтрофилов		
	Снижен, n (%)	Норма, n (%)	Итого
I стадия	9 (52,9)	8 (47,1)	17 (100%)
II стадия	17 (89,5)	2 (10,5)	19 (100%)
III стадия	8 (53,3)	7 (46,7)	15 (100%)
IV стадия	1 (16,7)	5 (83,3)	6 (100%)
Итого	35 (61,4%)	22 (38,6)	57 (100%)
	p=0,006		

Кроме того, нами выявлена взаимосвязь стадии N с уровнем палочкоядерных нейтрофилов. При отсутствии поражения лимфоузлов (N0) у больных повышенное содержание палочкоядерных нейтрофилов отмечалось в 28,0% случаев, тогда как при стадии N2 только в 8,3 %. При этом их сниженное содержание чаще отмечалось при стадии N1 (11,8% против 8,3%), тогда как при N0 этого не наблюдалось.

Оценив взаимосвязь состояния кроветворения с наличием ДОК в КМ больных НМРЛ, мы обнаружили достоверную взаимосвязь между общим количеством клеток гранулоцитарного ростка и наличием ДОК. При наличии

ДОК реже наблюдались случаи снижения или повышения уровней клеток гранулоцитарного ростка (Таблица 7).

Таблица 7 – Сумма клеток гранулоцитарного ростка в зависимости от ДОК статуса больных НМРЛ

ДОК в КМ		Сумма клеток гранулоцитарного ростка			Итого
		снижена n (%)	Норма n (%)	Повышена n (%)	
Отсутствуют	Частота	4 (12,5%)	11 (34,4%)	17 (53,1%)	32 (100,0%)
Присутствуют	Частота	1 (4,0%)	17 (68,0%)	7 (28,0%)	25 (100,0%)
Итого	Частота	5 (8,8%)	28 (49,1%)	24 (42,1%)	57 (100,0%)
p=0,036					

При изучении лимфоцитарных популяций КМ первым этапом проведена оценка среднего содержания зрелых Т-клеток и их субпопуляций. 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±2,1%, n=33 и 58,8±2,96%, n=9), p=0,01. При плоскоклеточном раке 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±1,8% (n=32) и 23,6±2,0% (n=9), p=0,003. Уровни CD4+ лимфоцитов не различались в зависимости от пола (p=0,9).

Далее нами проводилось сравнение содержания популяции В-клеток КМ больных НМРЛ в зависимости от пола, гистологического вида НМРЛ. Проведенный анализ выявил ряд интересных закономерностей. Уровни популяций В-клеток КМ больных НМРЛ были связаны с полом больных. Зрелые В-клетки (CD20+CD45++) достоверно преобладали у женщин: 25,3±4,97% (n=7) и 15,8±1,8% (n=26), p=0,032. При изучении взаимоотношений морфологического типа НМРЛ и уровня В-лимфоцитов обнаружилось, что CD20+CD45++клетки также преобладали при АК легкого в сравнении с ПКР: 21,7±3,1% (n=17) и 13,7±1,4% (n=16). Различия статистически значимы: p=0,025.

Далее нами был проведен анализ взаимосвязи уровней минорных субпопуляций перфорин-содержащих лимфоцитов КМ с гистологическим видом опухоли (Таблица 8).

Таблица 8 – Средние уровни перфорин-позитивных лимфоцитов КМ больных АК и ПКР легкого

Субпопуляция лимфоцитов	Гистология	N	Среднее	Стд. ошибка среднего	P
CD8+Перфорин+	плоскоклеточный	17	10,0	1,7	
	аденокарцинома	21	10,8	2,7	0,82
CD45+Перфорин+	плоскоклеточный	17	18,2	2,3	
	аденокарцинома	21	22,7	4,2	0,38
CD8-Перфорин+	плоскоклеточный	17	12,1	1,2	
	аденокарцинома	21	14,5	2,7	0,48
CD4+Перфорин+	плоскоклеточный	17	2,1	0,4	
	аденокарцинома	21	10,1	2,6	0,008
CD4-Перфорин+	плоскоклеточный	17	20,0	2,4	
	аденокарцинома	21	18,1	3,2	0,67
CD27+Перфорин+	плоскоклеточный	17	0,78	0,1	
	аденокарцинома	21	2,0	0,5	0,033

Минорные популяции цитотоксических CD4-лимфоцитов и CD27-лимфоциты, содержащие перфорин, были более выраженными при аденокарциноме легкого: 10,1% и 2,9% против 2,1% и 0,78%. Факт обнаружения достоверно более высоких показателей CD27-позитивных клеток, экспрессирующих перфорин, при аденокарциноме легкого является новым и требует дальнейшего изучения (Рисунок 3).

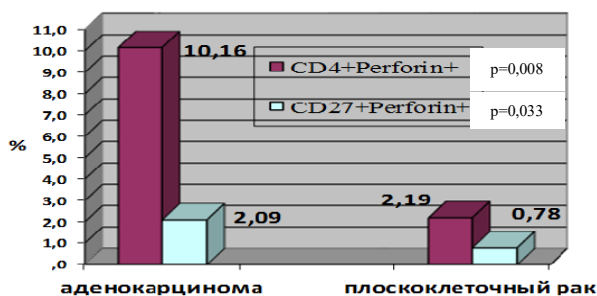


Рисунок 3 – Уровень содержания CD4+Перфорин+, CD27+Перфорин+лимфоцитов КМ в зависимости от гистологического типа НМРЛ

Таким образом, по результатам проведенного анализа взаимосвязи ДОК статуса с клинико-морфологическими характеристиками опухоли, установлено, что ДОК при НМРЛ выявляются в 43,5% случаев, при этом даже у больных с локализованным опухолевым процессом. Последнее отражает, что гематогенное метастазирование начинается на ранних этапах развития НМРЛ. Отмечено, что ДОК достоверно чаще обнаруживаются при высоко дифференцированном раке. Проведенный анализ наличия взаимосвязи между ДОК статусом и показателями миелограммы больных НМРЛ, следует признать, что есть тенденция к перестройке КМ микроокружения ДОК, однако не все описанные наблюдения носили достоверный характер. Возможно, это связано с тем, что в нашем исследовании преобладали больные с ранними операбельными стадиями НМРЛ и количество выявленных ДОК у большинства больных не превышало 10 на 20 млн. миелокариоцитов. Вероятно, изменения в КМ происходят постепенно и зависят от количества ДОК и их активности. Кроме того, нами установлен факт достоверно более высоких показателей CD27-позитивных клеток, экспрессирующих перфорин, при АК легкого. Вероятнее всего речь идет об эффекторных Т-клетках памяти, на которых коэкспрессия данных молекул (гранзим В, перфорин) возможна.

ВЫВОДЫ

1. Диссеминированные опухолевые клетки выявляются в костном мозге больных раком легкого с высокой частотой – 43,5% при использовании порогового уровня 1 клетки на 10 млн. миелокариоцитов (1×10^{-7}). При пороговых уровнях 1×10^{-6} и 1×10^{-5} частота поражения костного мозга составила 6,65% и 1,6%.

2. Случаи НМРЛ с наличием диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге не имели клинических и морфологических особенностей: не установлено различий по полу, возрасту больных, размеру опухоли (Т), наличию метастазов в регионарных лимфатических узлах (N), стадии заболевания. Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге не различалась при плоскоклеточном раке легкого и аденокарциноме легкого.

Диссеминированные опухолевые клетки выявлялись достоверно чаще при дифференцировке опухоли G1.

3. Выявление диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных НМРЛ ассоциируется с определенными показателями гемопоэза и чаще наблюдается при нормальных уровнях гранулоцитарного ростка, чем в случаях снижения или повышения этих клеток.

4. Гистологические варианты НМРЛ различаются по субпопуляционному составу клеток костного мозга: для плоскоклеточного рака легкого более характерным является повышение Т-клеток (CD3) и CD8-клеток (Т- и НК), а для аденокарциномы – зрелых В-клеток (CD45++ CD20+). Иными словами, для плоскоклеточного рака характерно напряжение звеньев Т- и НК-клеточного иммунитета, а для аденокарциномы – гуморального иммунитета.

5. Эффекторные (перфорин-содержащие) субпопуляции костномозговых лимфоцитов достоверно различаются при аденокарциноме и плоскоклеточном легкого: для аденокарциномы характерны достоверно более высокие уровни перфорин-содержащих CD4-лимфоцитов и CD27-лимфоцитов.

6. Эффекторные субпопуляции лимфоцитов костного мозга находятся в реципрокных отношениях с предшественниками эритропоэза, что наиболее отчетливо проявляется на уровне полихроматофильных нормобластов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тупицын, Н.Н. Иммунологические показатели костного мозга больных немелкоклеточным раком лёгкого. / Н.Н. Тупицын, Т.М. Джуманазаров, А.Д. Палладина, А.К. Аллахвердиев, С.В. Чулкова, П.В. Кононец // Российский биотерапевтический журнал. – 2020. – Т. 19. – № 2. – С. 47-54.

2. Джуманазаров, Т.М. Детекция диссеминированных опухолевых клеток и их взаимосвязь с популяцией костномозговых лимфоцитов у больных немелкоклеточным раком лёгкого. / Т.М. Джуманазаров, С.В. Чулкова, Н.Н. Тупицын, О.А. Чернышева, А.К. Аллахвердиев, А.Д. Палладина, Н.А.

Купрышина, О.П. Колбацкая, П.В. Кононец, Б.Б. Ахмедов, С.С. Герасимов // Современная онкология. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 94-99.

3. Чулкова, С.В. Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных немелкоклеточным раком лёгкого. / С.В. Чулкова, Н.Н. Тупицын, Т.М. Джуманазаров, А.Д. Палладина, Н.А. Купрышина, О.А. Чернышева, А.К. Аллахвердиев, О.П. Колбацкая, П.В. Кононец // Российский биотерапевтический журнал. – 2020. – Т. 19. – №3. – С.29-37.

Подписано в печать: 19.11.2020
Заказ №18100. Тираж - 100 экз.
Бумага офсетная. Формат 60х90/16.
Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(977) 518-13-77 (499) 788-78-56
www.avtoreferat.ru riso@mail.ru