

КОЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ИММУННЫХ ТОЧЕК PD-1, PD-L1, TIM3 И LAG3 В ПОПУЛЯЦИЯХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ И ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

© 2019 г. О. В. Курмышкина¹, А. А. Богданова^{1,2}, П. И. Ковчур¹, Т. О. Волкова^{1*}

*E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия;

²ФГБУН «Институт биологии КарНЦ» РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия.

Поступила: 26.06.2019. Принята: 02.08.2019

В статье рассмотрены результаты иммунофенотипирования Т-лимфоцитов по маркерам контрольных точек иммунного ответа, представляющих перспективные мишени противоопухолевой иммунотерапии, у пациенток с ранними стадиями вирус-ассоциированного рака шейки матки. Обсуждаются различия в профиле экспрессии данных маркеров субпопуляциями лимфоцитов в составе опухоли и в периферической крови.

Ключевые слова: противоопухолевый иммунитет, контрольные точки иммунного ответа, вирус-ассоциированный рак, цервикальные неоплазии, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, регуляторные Т-клетки

DOI: 10.31857/S102872210007068-9

Адрес: 185910 Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33, ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Волкова Татьяна Олеговна. Тел./факс: +7(8142) 795322.

E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

Авторы:

Курмышкина О. В., к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики врожденного иммунитета Института высоких биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» Минобрнауки РФ, Петрозаводск, Россия;

Богданова А. А., аспирант лаборатории экологической биохимии ФГБУН «Институт биологии КарНЦ» РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия; Госзадание № 6.5111.2017/8.9;

Ковчур П. И., д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии, ЛОР-болезней, офтальмологии, стоматологии, онкологии, урологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» Минобрнауки РФ, Петрозаводск, Россия;

Волкова Т. О., д.б.н., профессор кафедры биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института, директор Института высоких биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» Минобрнауки РФ, Петрозаводск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Достижение положительного эффекта от применения методов иммунотерапии рака предполагает многоточечное воздействие на функционально различные механизмы иммунного

ответа, в том числе ингибиторные механизмы, реализуемые через «контрольные точки» иммунитета (ИКТ). Если рассматривать Т-клеточное звено, роль маркеров ИКТ, например, PD-1 (CD279) /PD-L1 (CD274), в определении функционального состояния Т-лимфоцитов обусловлена не только уровнем их экспрессии, но и совокупностью других факторов, в частности: профилем их совместной экспрессии с другими ИКТ или, наоборот, маркерами Т-клеточной активации, принадлежностью к той или иной субпопуляции Т-клеток, локализацией Т-клеток (первичная опухоль, лимфоузлы, периферическая кровь), стадией онкологического заболевания и его этиологией. В случае вирус-ассоциированных опухолей, включая обусловленные папилломавирусной (ВПЧ) инфекцией, вирусная этиология может определять особенности процессов иммунного ответа с участием ИКТ [1], при этом рак шейки матки (РШМ) является наименее исследованным в отношении ИКТ видом ВПЧ-зависимого рака [2].

Несмотря на то, что представленные в литературе немногочисленные исследования ИКТ при РШМ охватывают в основном формы метастатического, резистентного, рецидивирующе-

го рака [2, 3], большой интерес для понимания механизмов противоопухолевого действия ингибиторов ИКТ и поиска биомаркеров – предикторов клинического ответа представляют те изменения, которые сопровождают ранние этапы прогрессии опухоли.

Целью данной работы являлся сравнительный анализ паттерна коэкспрессии PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274/B7-H1), TIM3 (CD366) и LAG3 (CD223) в основных популяциях Т-лимфоцитов, выделенных из образцов опухолевой ткани и периферической крови пациенток с ранними формами ВПЧ(+) РШМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы цервикального эпителия и периферической крови были получены в ходе операции от пациенток с диагнозом плоскоклеточный РШМ0-I стадии (n=20) и подтвержденным ВПЧ(+) статусом, проходивших лечение в ГБУЗ Республиканский онкологический диспансер. Забор крови был также выполнен у 20 здоровых ВПЧ(-) женщин, не имеющих патологий шейки матки (группа контроля). Анализ экспрессии ИКТ проводился методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (BioLegend, Miltenyi Biotec, Dako) и комбинации флуорофоров: FITC (CD4 или CD8), PE-Vio770/PE-Cy7 (CD25), APC-Vio770/APC-Cy7 (CD127), PE (PD-1), PerCP-Cy5.5 (PD-L1), APC (TIM3 или LAG3). Границы позитивных/негативных популяций устанавливались с помощью серии Fluorescent Minus One контролей. Для иммунофенотипирования опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) образцы ткани подвергались мягкой ферментативной диссоциации (в присутствии 0.2% коллагеназы) с получением суспензии одиночных клеток. Статистическая достоверность оценивалась согласно критерию Уилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

При анализе результатов цитометрии лимфоцитов периферической крови (ЛПК) и ОИЛ были выделены: 1) общая популяция CD4 и CD8 Т-клеток; 2) субпопуляции CD4⁺CD8⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ Т-клеток; 3) CD4⁺CD8⁺CD25^{+/high}CD127^{-/low} (регуляторные Т-клетки/Трег), CD4⁺CD8⁺CD25^{-/low}CD127⁺ (рассматриваемые как конвенциональные не-Трег лимфоциты) и CD4⁺CD25⁻CD127⁻. В пределах данных популяций оценивалась доля клеток, экспрессирующих ИКТ-маркеры PD-1, PD-L1, TIM3 и LAG3 (каж-

дый маркер в отдельности и совместно два или три маркера).

При сравнении уровня экспрессии (в % окрашенных клеток) PD-1 и PD-L1 в общих популяциях CD4 и CD8 ЛПК наиболее значимое увеличение в группе больных (относительно контроля) наблюдалось для CD8 Т-клеток; увеличение % TIM3 и % LAG3 Т-клеток выявлено как в CD4, так и в CD8 звене, но в случае CD8 популяции оно было более выраженным. Кроме того, при РШМ отмечалось увеличение доли циркулирующих CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, позитивных одновременно по двум и трем ИКТ. Сопоставление с экспрессией CD25 выявило существенное увеличение доли CD25⁺PD1⁺ как среди CD4, так и CD8 ЛПК, а также доли CD25⁺TIM3/LAG3⁺ среди CD4 Т-клеток. Более того, в популяции CD4⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов от пациенток с РШМ была повышена доля клеток, ко-экспрессирующих 2 и 3 ИКТ (PD1⁺PD1⁺TIM3⁺ и PD1⁺PD1⁺LAG3⁺), в то время как для CD4⁺CD25⁻ Т-клеток различия в экспрессии ИКТ между группами здоровых и больных были менее выражены или отсутствовали. Схожие наблюдения получены в отношении CD8⁺CD25⁺ популяции ЛПК, в которой наиболее заметно увеличивалась доля PDL1⁺TIM3⁺ и PDL1⁺LAG3⁺ клеток в группе РШМ, при отсутствии достоверных различий в паттерне коэкспрессии ИКТ между группами больных и здоровых для CD8⁺CD25⁻ популяции, что подтверждает специфичность наблюдаемых изменений. В целом, различия между группами контроля и РШМ-пациенток в уровне экспрессии ИКТ-маркеров на CD4⁺CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитах более выражены, чем в общей CD4/CD8 популяции, при этом доля CD4⁺CD8⁺CD25⁺ Т-клеток была выше в группе больных. В совокупности полученные результаты позволяют предположить, что популяции CD4⁺CD25⁺ и CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов (включающие активированные Т-эффекторы и Трег), которые ко-экспрессируют 2 или 3 ИКТ-маркера, вовлечены в ранние этапы прогрессии вирус-ассоциированного РШМ. Анализ минорных популяций ЛПК CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} и CD8⁺CD25⁺CD127⁻ выявил увеличение частоты PD1⁺, PD1⁺PD1⁺ клеток (для CD4) и PDL1⁺, LAG3⁺ (для CD8) в группе РШМ.

При рассмотрении популяций CD4 и CD8 Т-клеток в образцах пре- и микроинвазивного РШМ обнаружены существенные различия между ОИЛ и ЛПК в профиле экспрессии ИКТ. В целом, для ОИЛ характерен более высокий процент клеток, экспрессирующих ИКТ (в особенности

ТІМ3 и PD-1); кроме того, по сравнению с ЛПК, большая доля CD4 и CD8 ОИЛ одновременно имеет два или три ИКТ-маркера, что повышает вероятность их нахождения в состоянии иммунного «истощения». С другой стороны, появление ИКТ на ОИЛ может быть следствием их активации и, действительно, по сравнению с ЛПК, подавляющая доля ОИЛ была положительной по CD25. Различия между ЛПК и ОИЛ были наиболее заметными для CD8 Т-клеток, при этом в большей степени экспрессия PD-1 и ТІМ3 была ассоциирована с CD25⁺ ОИЛ. Аналогичная тенденция наблюдалась для CD25^{+/high}CD127^{-/low} Т-клеток, представленность которых в ОИЛ существенно выше, по сравнению с циркулирующей, снаиболее выраженными различиями, выявленными для CD8⁺ популяции. Значительная доля Трег в составе РШМ-инfiltrата были позитивны по 2 или 3 ИКТ (наиболее важным данное наблюдение является в отношении CD8 ОИЛ, вклад которых в локальный иммунный ответ при прогрессии РШМ может быть преобладающим [3]). В целом, результаты свидетельствуют о том, что на раннем этапе перехода от внутриэпителиального развития к инвазивному росту для РШМ характерно увеличение уровня совместной экспрессии ИКТ на ОИЛ с одновременно высоким уровнем

представленности клеток с Трег-фенотипом, что может существенно ограничивать противоопухолевый иммунный ответ и создавать условия для прогрессии местно-распространенных и метастазирующих форм.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 17-15-01024). Исследования проведены в соответствии с планом реализации Программы развития опорного университета ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» на период 2017–2021 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Wang HF, Wang SS, Tang YJ, Chen Y, Zheng M, Tang YL, Liang XH. The Double-Edged Sword-How Human Papillomaviruses Interact With Immunity in Head and Neck Cancer. *Front Immunol.* 2019, 10, 653.
2. Liu Y, Wu L, Tong R, Yang F, Yin L, Li M, You L, Xue J, Lu Y. PD-1/PD-L1 Inhibitors in Cervical Cancer. *Front Pharmacol.* 2019, 10, 65.
3. Heeren AM, Rotman J, Stam AGM, Pocorni N, Gas-sama AA, Samuels S, Bleeker MCG, Mom CH, Zijl-mans HJMAA, Kenter GG, Jordanova ES, de Gruijl TD. Efficacy of PD-1 blockade in cervical cancer is related to a CD8⁺FoxP3⁺CD25⁺ T-cell subset with operational effector functions despite high immune checkpoint levels. *J Immunother Cancer.* 2019, 7, 43.

COEXPRESSION OF IMMUNE CHECKPOINT MARKERS PD-1, PD-L1, TIM-3, AND LAG-3 IN CIRCULATING AND TUMOR-INFILTRATING T CELL POPULATIONS IN CERVICAL CANCER PATIENTS

© 2019 O. V. Kurmyshkina¹, A. A. Bogdanova^{1,2}, P. I. Kovchur¹, T. O. Volkova^{1*}

*E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

¹Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia;

²Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the RAS, Petrozavodsk, Russia

Received: 26.06.2019. Accepted: 02.08.2019

The article presents the results of immunophenotyping performed on T cells from early-stage cervical cancer patients using immune checkpoint markers considered as promising and valid targets for antitumor immunotherapy. The differences in the expression pattern of these markers between lymphocyte subpopulations isolated from the tumor site or peripheral blood are discussed.

Key words: antitumor immunity, immune checkpoints, virus-associated cancer, cervical neoplasia, tumor-infiltrating lymphocytes, regulatory T cells

Authors:

Kurmyshkina O. V., PhD, senior researcher, Laboratory of Molecular Genetics of Innate Immunity, Institute of High-Tech Biomedicine, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia;

Bogdanova A. A., PhD student, Laboratory for Environmental Biochemistry, Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia; government contract № 6.5111.2017/8.9;

Kovchur P. I., MD-PhD, professor of the Department of hospital surgery, ENT diseases, ophthalmology, dentistry, oncology, urology, Institute of Medicine, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia;

Volkova T. O., ☒ PhD, professor of the Department of biomedical chemistry, immunology and laboratory diagnostics, Institute of Medicine; director of the Institute of High-Tech Biomedicine; Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia. **E-mail:** VolkovaTO@yandex.ru