

УДК 612.017.1:616.31-006.6-078.33

ФАКТОРЫ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА И ЯЗЫКА С ОТСУТСТВИЕМ И НАЛИЧИЕМ РЕГИОНАРНЫХ МЕТАСТАЗОВ И РЕЦИДИВОВ

Златник Е.Ю., Светицкий П.В., Новикова И.А., Нистратов Г.П., Аединова И.В., Волкова В.Л., Баужадзе М.В., Ульянова Е.П., Загора Г.И., Селютина О.Н.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Проведено сравнительное исследование показателей локального иммунитета в тканях опухоли и перитуморальной области 69 больных раком языка и слизистой дна полости рта без рецидивов и метастазов, с регионарными метастазами и с рецидивами с помощью ИФА и иммуногистохимических методов. Показан высокий уровень провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8) в ткани опухоли, превышающий их содержание в перитуморальной зоне. Выявлено преобладание CD3+CD8+ клеток среди изученных Т-лимфоцитарных субпопуляций, а также их максимальное количество в опухолях больных без метастазов и минимальное – у больных с регионарными метастазами. Присутствие CD68+ макрофагов было наиболее выраженным на границе опухоли и перитуморальной зоны у больных без метастазов. Итак, установлен ряд особенностей локального иммунитета у больных первичным, рецидивирующим и метастазирующим раком слизистой полости рта.

Ключевые слова: рак слизистой полости рта, локальный иммунитет, лимфоциты, цитокины

FACTORS OF LOCAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH ORAL MUCOSA AND TONGUE CARCINOMA WITH ABSENCE AND PRESENCE OF REGIONAL METASTASES AND RECURRENCES

Zlatnik E.Y., Svetickiy P.V., Novikova I.A., Nistratov G.P., Aedinova I.V., Volkova V.L., Bauzhadze M.V., Uljanova E.P., Zakora G.I., Seliutina O.N.

Rostov Research Oncologic Institute of Ministry of Health the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Comparative study of local immunity in tissues of tumor and paratumoral area of 69 patients with primary carcinoma of oral cavity mucosa, relapse and metastatic tumor was carried out by means of ELISA and IHC methods. Higher levels of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-8) were found in tumor tissue than in paratumoral area. Prevalence of CD3+CD8+ T-lymphocytes over CD3+CD4+ was observed. CD3+CD8+ cells' amount was higher in non-metastatic tumors than in metastatic ones. Presence of CD68+ macrophages was maximal on the border between tumor and paratumoral area in patients without metastases. Thus some peculiarities of local immunity associated with metastases and relapse in patients with carcinoma of oral cavity mucosa were demonstrated.

Keywords: carcinoma of oral cavity mucosa, local immunity, lymphocytes, cytokines

Биологическое поведение злокачественной опухоли, которое характеризует скорость ее роста, способность к инвазии и распространению, а, в конечном итоге, и прогноз заболевания, зависит от многих причин, связанных как с ее особенностями, так и с эффективностью или неэффективностью системных защитных механизмов, среди которых важное место занимают иммунные. По-видимому, свойства опухоли и реакции иммунной системы организма на нее тесно взаимосвязаны. С учетом значения иммунокомпетентных клеток в процессах апоптоза, пролиферации, неоангиогенеза (в частности, через продукцию цитокинов), их роль в микроокружении опухоли представляется существенной, однако, не полностью проясненной. Иммунная защита организма от опухоли осуществляется не только на системном, но и на локальном уровне. Участие в ней различных клеточных факторов, главным образом, Т- и НК-

клеток, а также их растворимых продуктов, в настоящее время не подлежит сомнению [4, 6, 7]. Однако, хотя присутствие иммунокомпетентных клеток и гуморальных факторов в микроокружении опухоли давно описано, их роль в очаге расценивается двояко, т.е. они рассматриваются как факторы, не только способствующие ее регрессии, но и могущие стимулировать ее рост, тем более, при распространенных стадиях [1, 8, 9].

Оценка факторов локального иммунитета у онкологических больных, в частности, при раке слизистой полости рта и языка, представляет собой важную проблему, могущую иметь теоретические и прикладные аспекты.

Цель исследования

Провести сравнительную оценку факторов клеточного и гуморального иммунитета в тканевых образцах опухоли и ее перитуморальной зоны у больных раком слизистой

полости рта и языка без метастазов, с регионарными метастазами и с рецидивами.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования были 69 больных раком слизистой полости рта и языка (55 мужчин, 14 женщин; возраст 40–77 лет), которые были разделены на 3 группы по 23 человека: 1-я группа больных без регионарных метастазов и рецидивов, 2-я – с наличием метастазов, 3-я – с рецидивами. Больные проходили лечение в отделении опухолей головы и шеи ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ в 2006–2014 гг. Распространенность процесса у больных первых двух групп составила: со II стадией (T2N0M0) было 10 человек, с III – 25 (T2N1M0 – 4, T3N0M0 – 13, T3N1M0 – 8), с IV – 11 (T3N2M0 – 2, T4N0M0 – 5, T4N1M0 – 4). У 57 (82,6%) больных опухолевым процессом был поражен язык, у 12 (17,4%) – слизистая дна полости рта. На языке опухоль располагалась чаще на боковой поверхности (52,2%). У всех больных был плоскоклеточный рак, с высокой степенью дифференцировки (G1) у 18 больных, средней (G2) – у 34 и низкой (G3) – у 17.

В тканевых гомогенатах образцов опухоли и перитуморальной зоны (неизменная ткань на расстоянии 1–3 см от опухоли) проводили определение уровней про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-α, IFN-γ, TNF-α) методом ИФА с тест-системами производства «Вектор-Бест» (Новосибирск); результаты выражали в пг/мл; удельное содержание цитокинов вычисляли путем пересчета полученных данных на 1 г белка. В срезах тканей оценивали содержание основных субпопуляций Т-лимфоцитов методом ИГХ с антителами к CD4, и CD8, CD68 фирмы DAKO.

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительная характеристика удельных уровней цитокинов в тканях опухоли и перитуморальной зоны (ПЗ) представлена в таблице. Вариабельность значений оказалась существенной; несмотря на это, удалось установить ряд статистически достоверных различий содержания провоспалительных цитокинов.

Как видно из таблицы, в опухолевой ткани по сравнению с ПЗ отмечено статистически значимо более высокое содержание провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8 в группе больных без регионарных метастазов; у больных с регионарными метастазами наблюдались сходные различия. При рецидивах подобная разница отмечена только по уровню IL-6, но она оказалась статистически недостоверной вследствие высокой индивидуальной вариабельности показателей. Тканевые уровни интерферонов, IL-2 и IL-10 в опухоли и в ПЗ были невысоки и не имели статистически достоверных различий.

Сопоставление исследованных показателей в ткани опухоли выявило отсутствие статистически значимых различий между данными больных различных групп. В ткани ПЗ сравниваемых групп обнаружены некоторые отличия, например, у больных 3-й группы по сравнению с больными 1-й группы отмечено более высокое содержание TNF-α ($2,32 \pm 0,357$ против $1,47 \pm 0,24$ пг/мл/г белка) и IL-1β ($26,5 \pm 10,7$ против $4,7 \pm 0,71$ пг/мл/г белка); для обоих показателей различия статистически достоверны ($P < 0,05$).

Таким образом, показан ряд статистически значимых различий тканевого уровня цитокинов между тканью опухоли и перитуморальной области с преобладанием содержания провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8 в опухолевой ткани. При рецидивах в тканевых образцах ПЗ и опухоли утрачиваются различия по IL-1β, IL-6 и IL-8, выраженные в двух других группах, что говорит о приближении иммунологических характеристик визуально немалигнизированной ткани к опухолевой и может косвенно свидетельствовать об утрате ею свойств, ограничивающих пролиферативный потенциал опухоли.

Удельное содержание цитокинов в тканях опухоли и ПЗ больных различных групп (пг/мл/г белка)

| Цитокины | Группы больных, образцы тканей | | | | | |
|----------|--------------------------------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | 1-я | | 2-я | | 3-я | |
| | Опухоль | ПЗ | Опухоль | ПЗ | Опухоль | ПЗ |
| TNF-α | $2,32 \pm 1,16$ | $1,47 \pm 0,24$ | $2,83 \pm 0,91$ | $3,1 \pm 0,96$ | $2,82 \pm 0,78$ | $2,32 \pm 0,357$ |
| IL-8 | $16,3 \pm 3,5^*$ | $5,5 \pm 2,33$ | $26,7 \pm 7,2^*$ | $7,3 \pm 2,78$ | $17,0 \pm 7,4$ | $12,7 \pm 7,2$ |
| IL-6 | $7,1 \pm 3,2^*$ | $0,71 \pm 0,158$ | $5,95 \pm 2,03^*$ | $1,23 \pm 0,49$ | $13,3 \pm 7,3$ | $1,4 \pm 0,56$ |
| IL-10 | $2,5 \pm 0,33$ | $2,42 \pm 0,33$ | $2,92 \pm 1,1$ | $3,64 \pm 1,69$ | $1,23 \pm 0,4$ | $1,84 \pm 0,5$ |
| IL-1β | $14,4 \pm 3,8^*$ | $4,7 \pm 0,71$ | $19,0 \pm 4,2^*$ | $6,7 \pm 2,1$ | $17,5 \pm 8,2$ | $26,5 \pm 10,7$ |
| IL-1RA | 492 ± 83 | $397 \pm 33,4$ | – | – | – | – |
| IFN-α | $0,576 \pm 0,1$ | $0,548 \pm 0,09$ | $0,442 \pm 0,11$ | $0,47 \pm 0,08$ | – | – |
| IFN-γ | $1,3 \pm 0,2$ | $1,576 \pm 0,19$ | $1,26 \pm 0,17$ | $2,35 \pm 0,76$ | – | – |
| IL-2 | $0,533 \pm 0,06$ | $0,5 \pm 0,06$ | $0,884 \pm 0,24$ | $1,19 \pm 0,56$ | – | – |

Примечание. * – статистически достоверные отличия от показателей ПЗ ($P < 0,05$).

Вероятно, избыток провоспалительных цитокинов, у которых описаны ростостимулирующие свойства [1], наблюдается за счет их продукции опухолевыми клетками, а также присутствующими в очаге активированными макрофагами, что способствует росту и распространению опухоли.

При морфологическом исследовании в строме и паренхиме опухолевой ткани выявлено наличие лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации различной степени выраженности: от незначительной (одиночно рассеянные лимфоциты и мелкие лимфоцитарные инфильтраты) до более выраженной преимущественно расположенной на границе опухоли с ПЗ.

Имуногистохимическое (ИГХ) исследование с использованием моноклональных антител к Т-лимфоцитарным субпопуляциям: Т-хелперам (CD4) и Т-цитотоксическим (CD8) лимфоцитам, а также макрофагам (CD68) позволило оценить состав иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих опухоль.

Результаты ИГХ-исследования выявили ряд общих черт для опухолей сравниваемых групп. Так, во всех группах отмечено преобладание в лимфоцитарно-макрофагальном инфильтрате CD8+ лимфоцитов над CD4+

клетками, а также выраженная инфильтрация CD68+ макрофагами, тогда как инфильтрация CD4+ клетками была представлена в виде одиночных лимфоцитов, разрозненно расположенных как в строме, так и в зонах сплошного опухолевого роста (рис. 1).

Были обнаружены и некоторые различия между сравниваемыми группами. Так, в 1-й группе выявлена наиболее выраженная инфильтрация CD8+ лимфоцитами (рис. 2), как в строме опухоли, так и в паренхиме. Инфильтрация CD68+ макрофагами была также ярко выражена, составляя в паренхиме опухоли до 20%, в инфильтратах на границе опухоль – ПЗ от 20 до 40% инфильтрата (рис. 3).

В группах с метастазами и рецидивами отмечено более низкое содержание CD8+ лимфоцитов как в строме, так и в паренхиме опухоли, в сравнении с 1-й группой больных (рис. 2). В отдельных образцах ткани из 2-й группы выявлены только единичные CD8+ лимфоциты в паренхиме опухоли и более выраженная инфильтрация ими на границе опухоль – ПЗ. В образцах ткани больных 3-й группы на отдельных участках в зонах сплошного опухолевого роста отмечено формирование из CD8+ лимфоцитов скоплений по типу лимфоидных фолликулов.

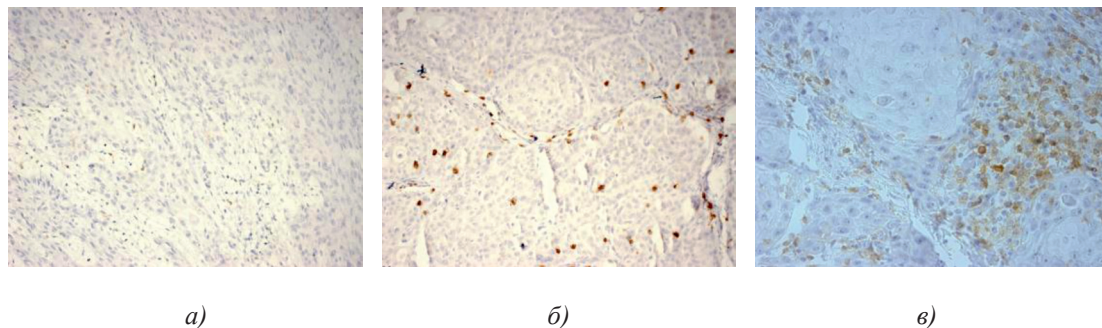


Рис. 1. Инфильтрация единичными CD4+ лимфоцитами опухолевой ткани:
а) 1-я группа; б) 2-я группа; в) 3-я группа. Ув. x 200

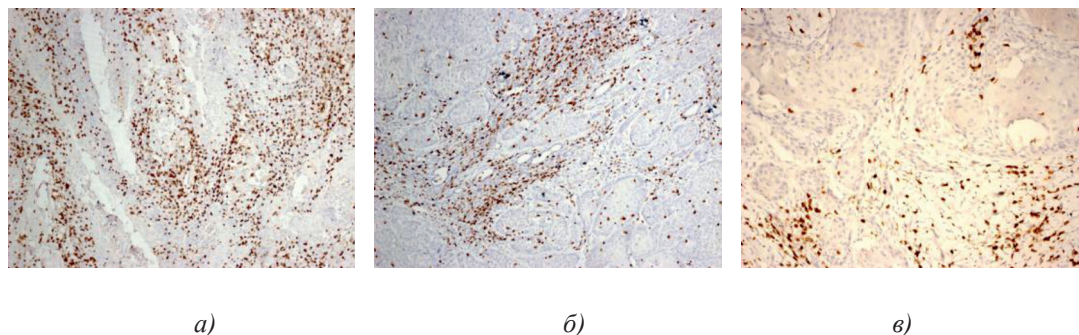


Рис. 2. Инфильтрация CD8+ лимфоцитами опухолевой ткани:
а) 1-я группа; б) 2-я группа; в) 3-я группа. Ув. x 100

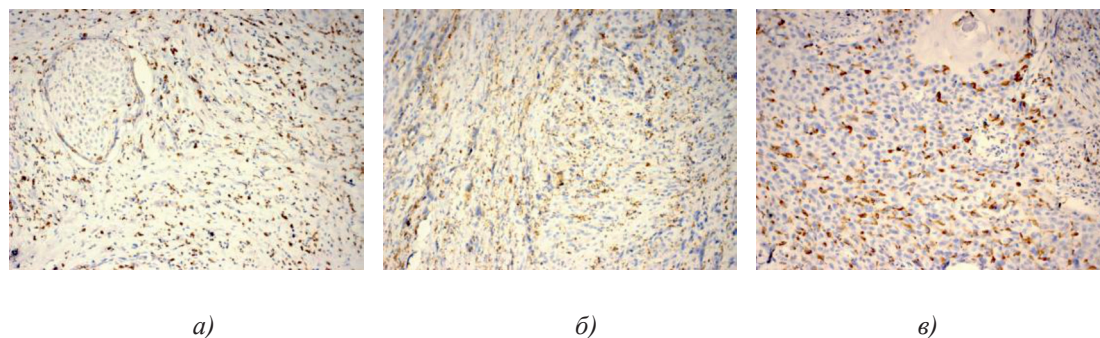


Рис. 3. Инфильтрация CD68+ макрофагами опухолевой ткани:
а) 1-я группа; б) 2-я группа; в) 3-я группа. Ув. х 200

Инфильтрация опухоли CD68+ макрофагами опухоли без метастазов также была выше, чем при их наличии. Так, на долю CD68+ макрофагов в лимфоцитарно-макрофагальном инфильтрате больных 1-й группы в паренхиме приходилось от 10 до 20%, на границе опухоли – ПЗ от 20 до 40%. В образцах ткани больных 2-й группы выявлено снижение доли CD68+ макрофагов до 10% как в строме опухоли, так и в ее паренхиме. Напротив, в группе с рецидивами отмечена обильная диффузная инфильтрация макрофагами и в строме и в паренхиме, составляющая до 40% инфильтрата (рис. 3, в).

Итак, инфильтрация опухолей и перитуморальных зон иммунокомпетентными клетками формируется, главным образом, за счет макрофагов и предшественников цитотоксических Т-лимфоцитов, содержание которых преобладает в группе больных, не имеющих метастазов, над метастатической и рецидивной. Скопление CD8+ и CD68+ клеток отмечено на границе опухоли и перитуморальной зоны. Сопоставляя данные, полученные по уровням провоспалительных цитокинов и по содержанию макрофагов в исследованных образцах, мы предполагаем, что, по-видимому, основной вклад в формирование высокого тканевого содержания цитокинов вносит продукция их опухолевыми клетками (несмотря на сопутствующее воспаление во многих случаях, связанное с активацией макрофагального звена). В опухолях метастатической группы присутствует меньшее количество макрофагов по сравнению с группой без метастазов, однако, высокие уровни IL-1 β , IL-6, IL-8 отмечены в образцах обеих групп; такое несоответствие можно объяснить преимущественной продукцией этих цитокинов опухолевыми клетками.

Вклад CD8+ лимфоцитов в продукцию исследованных нами лимфокинов, вероятно, невелик, поскольку их основными про-

дукцентами среди лимфоцитов считаются активированные CD4+ клетки, присутствие которых в тканевых образцах оказалось незначительным.

По данным литературы, оценка роли лимфоцитарной инфильтрации опухоли представляется неоднозначной, по-видимому, в связи с антигенной неоднородностью опухоли. Наличие или отсутствие экспрессии опухолевыми клетками различных антигенов, в частности, HLA I и II класса некоторые авторы связывают с различной степенью вовлеченности иммунокомпетентных клеток в противоопухолевый ответ [3]. В этих работах прослеживается (на примере рака молочной железы) положительная корреляция между Т-клеточной инфильтрацией опухоли (включая CD4+ и CD8+ лимфоциты) и положительным клиническим прогнозом, однако, судя по данным авторов, это относится к HLA-DR II позитивным опухолям [3]. В других исследованиях подчеркивается однозначно позитивная прогностическая роль инфильтрации CD8+ Т-клетками как предшественниками цитотоксических Т-лимфоцитов – эффекторов адаптивного иммунитета [5]. Преобладание CD8+ над CD4+ клетками, по-видимому, является общим свойством тканей, в отличие от крови, что подтверждено на примере рака слизистой полости рта и языка. Высокие уровни провоспалительных цитокинов, как показано в данной работе, отличают опухолевую ткань рака слизистой полости рта и языка от немалигнизированной, и могут быть неблагоприятным фактором ее развития и распространения, как было ранее продемонстрировано нами на примере опухолей других локализаций [2, 10].

Итак, установлен ряд особенностей локального иммунитета у больных первичным, рецидивирующим и метастазирующим раком слизистой полости рта и языка.

Выводы

1. Формирующийся высокий уровень провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, IL-8) в ткани опухоли слизистой полости рта и языка, могущий вносить вклад в прогрессию и диссеминацию опухоли, является вероятным следствием их продукции опухолевыми клетками; уровни этих цитокинов в ткани опухоли превышают их содержание в перитуморальной зоне.

2. Различия между перитуморальными зонами первичной и рецидивной опухолей по содержанию TNF-α и IL-1β свидетельствуют о приближении их цитокиновых характеристик к опухолевой ткани при рецидиве.

3. Преобладающей Т-лимфоцитарной субпопуляцией в опухоли являются CD3+CD8+ клетки, найденные в наиболее высоком количестве в опухолях больных без наличия метастазов и в минимальном – у больных с регионарными метастазами.

4. Присутствие макрофагов CD68+ является наиболее выраженным на границе опухоли и перитуморальной зоны у больных без наличия метастазов.

Список литературы

1. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. – Киев, Наукова Думка, 2005. – 790 с.
2. Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Никпелова Е.А., Загора Г.И., Геворкян Ю.А., Аверкин М.А. Локальный уровень цитокинов при раке толстой кишки // Известия ВУЗов Северо-Кавказский регион. Естеств. науки. Клин. онкология, акушерство, гинекология и педиатрия. Спецвыпуск. – 2011. – С. 48–51.
3. Летыгин В.П., Тупицын Н.Н., Артамонова Е.В. Варианты иммунофенотипа рака молочной железы и их клиническое значение для прогноза // VII российская онкологическая конференция. – М., 2003. – С. 50–53.
4. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. – М.: ВИНТИ РАН, 2001. – 222 с.
5. Шамилов Ф.А. Субпопуляции интратуморальных лимфоцитов при раке молочной железы // Онкология. – 2012. – № 2. – С. 60–65.
6. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М., Медицина 1999. – 456 с.

7. Balkwill F. Cancer and the chemokine network // Nat. Res. Cancer. – 2004; 4 (7): 540–550.
8. Fidler I.J. The organ microenvironment and cancer metastasis // Differentiation. – 2002; 70 (9–10): 498–505.
9. Lewis C.E., Pollard W.J. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments // Cancer res. – 2006; 66(2): 605–612.
10. Zlatnik E., Nerodo G., Mordan A., Mkrtychyan E. Factors of local immunity in patients with ovarian cancer // Europ. J. of Cancer. v. 49, suppl. 2, September 2013. P. 733. Abstr. 3069.

References

1. Berezhnaya N.M., Chehun V.F. *Immunologiya zlokachestvennogo rosta*. Kiev, Naukova Dumka, 2005. p. 790.
2. Kit O.I., Shaposhnikov A.V., Zlatnik E.Yu., Nikpelova E.A., Zakora G.I., Gevorkyan Yu.A., Averkina M.A. *Локальный уровень цитокинов при раке толстой кишки // Известия ВУЗов Северо-Кавказский регион. Естеств. науки. Клин. онкология, акушерство, гинекология и педиатрия. Спецвыпуск*. 2011. pp. 48–51.
3. Letyagin V.P., Tupitsyn N.N., Artamonova E.V. *Варианты иммунофенотипа рака молочной железы и их клиническое значение для прогноза // VII российская онкологическая конференция: М., 2003. pp. 50–53.*
4. Haitov R.M. *Физиология иммунной системы. М., ВИНТИ РАН 2001. p. 222.*
5. Shamilov F.A. *Subpopulyatsii intratumoralnykh limfotsitov pri rake molochnoy zhelezy // Onkologiya*. 2012. no. 2. pp. 60–65.
6. Yarilin A.A. *Osnovy immunologii. М., Meditsina 1999. p. 456.*
7. Balkwill F. *Cancer and the chemokine network // Nat. Res. Cancer*. 2004; 4 (7): 540–550.
8. Fidler I.J. *The organ microenvironment and cancer metastasis // Differentiation*. 2002; 70 (9–10): 498–505.
9. Lewis C.E., Pollard W.J. *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments // Cancer res*. 2006; 66(2): 605–612.
10. Zlatnik E., Nerodo G., Mordan A., Mkrtychyan E. *Factors of local immunity in patients with ovarian cancer // Europ. J. of Cancer*. v. 49, suppl. 2, September 2013. pp. 733. Abstr. 3069.

Рецензенты:

Каймакчи О.Ю., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского Государственного Медицинского Университета, г. Ростов-на-Дону;

Владимирова Л.Ю., д.м.н., профессор, руководитель отделения противоопухолевой лекарственной терапии № 1, ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону.