

УДК 616.345-006.6-021.3-031.14:612.017.1.

## ОСОБЕННОСТИ ОБЩЕГО И ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ОДИНОЧНОМ И СИНХРОННОМ ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННОМ РАКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

**Кит О.И., Златник Е.Ю., Никипелова Е.А., Геворкян Ю.А., Аверкин М.А., Новикова И.А., Дашков А.В.**

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздравсоцразвития России, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63, e-mail: rnoi@mail.ru*

В работе проводили изучение общего и локального субпопуляционного состава Т-, В- и NK-лимфоцитов у больных при одиночном и синхронном первично-множественном раке толстой кишки, а также содержание в образцах ткани кишки провоспалительных (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1RA) и противовоспалительных цитокинов (IL-2, IL-10). Объектами исследований были образцы ткани опухоли, перифокальной зоны (1-3 см) и ткани по линии резекции кишки в 10 см от края опухоли. Проведенные исследования показали, что особенности местного иммунитета связаны с формированием дисбаланса содержания основных субпопуляций лимфоцитов и цитокинов, возможно, благодаря способности к их продукции опухолями больных при одиночном и синхронном первично-множественном раке толстой кишки. Найденные изменения свидетельствуют о важной роли тканевых иммунно-воспалительных реакций в патогенезе одиночного и первично-множественного синхронного рака толстой кишки.

Ключевые слова: иммунитет, рак толстой кишки, лимфоциты, цитокины.

## PECULIARITIES OF GENERAL AND LOCAL IMMUNITY AT SOLITARY AND SYNCHRONOUS PRIMARY-MULTIPLE COLON CANCER

**Kit O.I., Zlatnik E.Y., Nikipelova E.A., Gevorkyan Y.A., Averkin M.A., Novikova I.A., Dashkov A.V.**

*Federal State Budget Institution "Rostov Research Oncologic Institute" Ministry of Health and Social Development of Russia, 63, 14 Line, Rostov-on-Don, 344037, e-mail: rnoi@mail.ru*

The study presents analysis of general and local subpopulation composition of T-, B- and NK-lymphocytes at solitary and synchronous primary-multiple colon cancer and concentration of pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 RA) and anti-inflammatory cytokines (IL-2, IL-10). Samples of tumour tissue, perifocal zones (1-3 cm), and tissue along resection line 10 cm from the tumour edge were studied. As the study showed, peculiarities of local immunity were related with formation of imbalance in concentration of main lymphocyte and cytokine subpopulations, due to tumour capacity to their production at solitary and synchronous primary-multiple colon cancer. These changes indicate to important role of tissue immune-inflammatory reactions in pathogenesis of solitary and primary-multiple synchronous colon cancer.

Key words: immunity, colon cancer, lymphocytes, cytokines.

В настоящее время отмечается рост показателя заболеваемости первично-множественными злокачественными новообразованиями (ПМЗНО) в России, который за последние 10 лет вырос в 2,3 раза и составил в 2005 г. 10,6 случая на 100 000 населения. Доля первично-множественных злокачественных новообразований среди всех впервые диагностированных ЗН в 2005 г. составила 3,4% (в 2003 г. – 7,5 случая, в 1991 г. – 1,9 случая) [7]. Одновременно наблюдается увеличение частоты встречаемости первично-множественного рака толстой кишки, который составляет 17% от всех наблюдений первично-множественных злокачественных новообразований [3].

Риск развития первично-множественных злокачественных новообразований толстой кишки составляет 6% от всех злокачественных новообразований толстой кишки, при этом риск синхронных, как и метасинхронных составляет по 3% [8].

Доказано, что одной из причин развития злокачественных новообразований является недостаточность иммунной защиты организма, особенно ее Т-клеточного звена. Последняя осуществляет контроль за соматическими клетками, результатом чего является элиминация любых клеток, несущих чужеродную генетическую информацию [9].

Иммунная система толстой кишки представлена организованной лимфоидной тканью, расположенной вдоль поверхности кишки (в собственной пластинке), которая включает изолированные и сгруппированные лимфоидные фолликулы, лимфоидную ткань червеобразного отростка, мезентериальные (брыжеечные) лимфатические узлы. В лимфоидных фолликулах слизистой оболочки толстой кишки содержатся главным образом В-лимфоциты, с некоторым количеством Т-лимфоцитов-хелперов (CD4+) и цитотоксических лимфоцитов (CD8+). В собственной пластинке слизистой оболочки толстой кишки, помимо плазматических клеток и Т-лимфоцитов, содержатся тканевые базофилы, макрофаги, В-лимфоциты, NK-клетки, эозинофилы и нейтрофилы [4; 6].

Наиболее активными участниками противоопухолевого иммунитета являются два типа клеток: Т- и NK- лимфоциты [2].

При изучении дифференцировки иммунокомпетентных клеток и механизмов межклеточного взаимодействия, формирующих клеточный и гуморальный иммунитет, была открыта большая группа медиаторов белковой природы, названных цитокинами. Их продукция рассматривается в качестве важнейшей характеристики функциональной активности мононуклеарных клеток (лимфоцитов и моноцитов) [6]. Важное место в осуществлении межклеточных взаимодействий и реализации противоопухолевого ответа иммунной системы принадлежит цитокиновой регуляции, в частности IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, IL-23, IFN- $\gamma$  и др. [1].

По основным механизмам действия цитокины подразделяются на ростовые (колониестимулирующие) факторы, контролирующие продукцию иммунокомпетентных клеток; провоспалительные (IL-1, 6, 8, 12, 18, TNF- $\alpha$  и др.), обеспечивающие мобилизацию и активацию клеток – участников воспаления; противовоспалительные цитокины (IL-2, 4 и др.) с альтернативным характером действия, ограничивающие развитие воспаления, регулирующие клеточный и гуморальный иммунитет [6]. Цитокины также регулируют процессы ангиогенеза, регенерации, пролиферации, апоптоза, метаболические процессы и т.д. [1; 6]. Основными продуцентами провоспалительных цитокинов являются

активированные моноциты, макрофаги, ДК, НК, а также Т- и В-лимфоциты; противовоспалительных – Т-клетки, преимущественно CD3+CD4+CD8- (Th1 и Th2).

В настоящее время известно, что многие цитокины (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-24) могут вырабатываться не только лимфоцитами, но и опухолевыми клетками, следовательно, способны проявлять себя как факторы усиления опухолевой прогрессии, активирующие ангиогенез и миграцию опухолевых клеток. TNF- $\alpha$ , являясь индуктором апоптоза и неоангиогенеза, может вызывать усиление гибели, например, лимфоцитов, находящихся на данной территории, и распространение туда опухолевых клеток [1].

Исходя из вышеперечисленного можно сделать вывод, что содержание субпопуляций лимфоцитов и уровень цитокинов в периферической крови и тканях играет важную роль в процессах канцеропрогрессии.

**Цель исследования.** Изучить содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови и тканях толстой кишки, а также уровень цитокинов в тканях толстой кишки при одиночном и первично-множественном синхронном раке толстой кишки (РТК).

#### **Материалы и методы**

Для изучения уровня субпопуляции лимфоцитов и цитокинов нами было проведено исследование периферической крови и ткани кишки у 46 больных одиночным раком толстой кишки и 17 больных первично-множественным синхронным раком толстой кишки (1–4 стадии).

Для изучения субпопуляции лимфоцитов периферической крови бралась кровь из локтевой вены натощак утром, в качестве антикоагулянта использовался гепарин. Для изучения внутритканевого уровня субпопуляций лимфоцитов были исследованы участки ткани кишки у 46 больных одиночным раком толстой кишки и 17 больных первично-множественным синхронным раком толстой кишки (1–4 стадии).

В ходе оперативных вмешательств проводилось удаление опухолевого очага с последующим исследованием ткани опухоли, а также визуально неизмененных участков кишки, отступя 1–3 см (перифокальная зона) и 10 см (линия резекции) от края опухоли. Последнюю считали нормой. Полученные образцы *ex tempore* помещали в среду 199 для исследования в лаборатории проточной цитометрии. Аналогичные участки, взятые в формалине, направляли в патоморфологическую лабораторию РНИОИ для верификации диагноза.

Локальный уровень субпопуляций лимфоцитов, выделенных из образцов ткани кишки и периферической крови, определяли иммунофенотипированием на проточном цитометре BDFACSCantoll (USA). Результаты выражали в %.

Локальный уровень провоспалительных (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1RA) и противовоспалительных цитокинов (IL-2, IL-10) в гомогенатах образцов ткани кишки определяли иммуноферментным методом. Образцы ткани отмывали в среде для удаления клеток крови, размельчали и гомогенизировали в растворе Версена на магнитной мешалке в течение 15 минут при температуре 22 °С, фильтровали через капроновый фильтр. Гомогенат стерильно отбирали и хранили при -20 °С в течение 1 месяца до иммуноферментного исследования, которое проводили с помощью наборов фирмы «Вектор-Бест». Результаты выражали в пг/мл. Кроме того, в гомогенате определяли биуретовым методом количество белка и удельное содержание цитокинов в расчете на один грамм белка.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием статистических пакетов Statistica 6.0 и Microsoft Excel 2007.

### Результаты исследования

Субпопуляционный состав лимфоцитов крови и исследованных образцов тканей больных одиночным и первично-множественным РТК представлен в таблицах 1 и 2.

**Таблица 1 – Субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных одиночным и синхронным раком толстой кишки**

Пробы крови	Субпопуляции лимфоцитов, %				
	CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD19+	CD16+/56+
Одиночный (n=46)	73,5 $\pm$ 2,28	42,3 $\pm$ 3,08	30,2 $\pm$ 3,0	10,43 $\pm$ 1,3	14,96 $\pm$ 1,92
Синхронный (n=17)	69,1 $\pm$ 0,72*	42,2 $\pm$ 2,4	26,36 $\pm$ 2,24	12,4 $\pm$ 2,0	17,1 $\pm$ 1,6

\* – статистически достоверные различия (P<0,05).

Как видно из таблицы 1, различия между двумя группами больных были незначительны, только лишь при одиночном раке уровень Т-лимфоцитов (CD3+) статистически достоверно был выше, чем при синхронном раке толстой кишки. По другим исследуемым субпопуляциям лимфоцитов статистически значимых отличий не обнаружено.

В отличие от иммунологических данных, характеризующих периферическую кровь, изучение локальных факторов клеточного иммунитета показало более выраженные изменения в группах больных с одиночными и синхронными раками толстой кишки (табл. 2).

**Таблица 2 – Субпопуляции лимфоцитов тканей больных одиночным и синхронным раком толстой кишки**

РТК	Образцы тканей	Субпопуляции лимфоцитов, %				
		CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD19+	CD16/56
Одиночный (n=46)	Опухоль	61,2±4,5■	33,0±3,0●	26,9±4,5	24,1±5,2■	12,4±3,5
	Перифокальная зона	47,6±5,1	21,4±3,8	21,0±5,1	43,64±7,6	10,8±3,0
	Линия резекции	49,0±7,5***	21,4±4,1	26,5±6,6***	35,8±5,3	13,9±4,9
Синхронный (n=17)	Опухоль	68,3±4,77■	33,5±3,23●■	32,1±4,7●	22,0±4,39■	5,2±1,96
	Перифокальная зона	48,6±5,09●	18,2±2,99	29,2±4,11●	37,4±4,3	11,18±5,0
	Линия резекции	64,2±5,87■	16,3±2,65	47,0±5,75■*	25,8±5,06	9,0±4,5

- – статистически достоверные отличия от линии резекции (P<0,05);
- – статистически достоверные отличия от перифокальной зоны (P<0,05);
- \* – от одиночного РТК;
- \*\*\* – от синхронного РТК.

Как видно из таблицы 2, в образцах одиночных и синхронных опухолей отмечается накопление Т-лимфоцитов (CD3+), в частности с фенотипом CD3+CD4+, содержание которых в опухоли статистически значимо было выше, чем в немалигнизированной ткани по линии резекции на 54% и в 2 раза соответственно, а количество В-лимфоцитов было ниже на 45 и 41% соответственно (P<0,05). При этом уровень CD3+CD8+ клеток в ткани синхронных опухолей и их перифокальных зон оказался статистически достоверно ниже, чем по линии резекции на 32 и 38% соответственно.

При исследовании ткани толстой кишки по линии резекции обнаружено, что при одиночных опухолях она содержит меньше на 44% ЦТЛ (CD3+CD8+), чем при синхронных. Состав других изученных субпопуляций лимфоцитов в перифокальных зонах по большинству показателей не выявил статистически значимых различий.

Удельное содержание цитокинов в образцах тканей толстой кишки у больных одиночным и первично-множественным синхронным раком толстой кишки представлено в таблице 3.

**Таблица 3 – Уровни цитокинов в образцах тканей больных одиночным и синхронным раком толстой кишки**

Образ-	Иссле-	Удельное содержание цитокинов (пг/мл белка)
--------	--------	---

цы тканей	дуемый мате- риал	IL-2	TNF - $\alpha$	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-1RA
РТК одиночный (n=46)	Опу- холь	3,29 $\pm$ 1,45	1,89 $\pm$ 0,43	14,24 $\pm$ 1,63 ●	33,0 $\pm$ 2,37● ■	1,52 $\pm$ 0,4	49,68 $\pm$ 11,4●■ ***	14,88 $\pm$ 5,11●	343 $\pm$ 25 *** ●■
	Пери- фокаль- ная зона	0,91 $\pm$ 0,146	0,64 $\pm$ 0,07 ***	4,9 $\pm$ 1,23	17,27 $\pm$ 2,27	0,7 $\pm$ 0,13 ***	17,7 $\pm$ 6,11	4,85 $\pm$ 2,1	220 $\pm$ 16,4
	Линия резек- ции	1,78 $\pm$ 0,53	1,04 $\pm$ 0,29	5,22 $\pm$ 1,09	13,0 $\pm$ 1,63	1,23 $\pm$ 0,36	18,8 $\pm$ 5,52	2,79 $\pm$ 1,53	234,2 $\pm$ 15,8
РТК синхронный (n=17)	Опу- холь	1,75 $\pm$ 0,25	2,35 $\pm$ 0,41 ●	12,85 $\pm$ 1,73●■	29,97 $\pm$ 2,73● ■	2,02 $\pm$ 0,47	18,0 $\pm$ 4,68*	15,65 $\pm$ 2,8●■	263 $\pm$ 17,3* ●■
	Пери- фокаль- ная зона	1,13 $\pm$ 0,21	1,34 $\pm$ 0,33 *	5,91 $\pm$ 1,01	14,9 $\pm$ 2,0	1,48 $\pm$ 0,36*	20,14 $\pm$ 4,82	2,52 $\pm$ 0,31●	210,7 $\pm$ 11,2
	Линия резек- ции	1,02 $\pm$ 0,29	0,95 $\pm$ 0,27 *	3,98 $\pm$ 0,86	12,7 $\pm$ 2,25	0,97 $\pm$ 0,24	12,5 $\pm$ 3,91 *	1,28 $\pm$ 0,34■	209,4 $\pm$ 17,3

Статистически достоверные отличия (P<0,05):

\* – от одиночного РТК;

\*\*\* – от синхронного РТК;

● – от линии резекции;

■ – от перифокальной зоны.

Сравнение удельного уровня цитокинов в исследуемых образцах одиночных и первично-множественных опухолей показало, что у больных с одиночным РТК содержание большинства из них было выше в опухоли, чем в немалигнизированной ткани. Такие различия статистически достоверны для IL-6, IL-8, IL-1 и IL-1RA. Образцы ткани синхронных опухолей также содержат статистически достоверно более высокие количества цитокинов, чем перифокальная зона (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  и IL-1RA) и ткань по линии резекции (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  и IL-1RA).

Результаты сопоставления уровня цитокинов в опухолевой ткани показали, что в синхронных опухолях определяется более низкий уровень IL-1 $\alpha$  и его антагониста, чем в одиночных.

В ткани перифокальной зоны синхронных опухолей уровни TNF- $\alpha$  и IL-10 были в 2 раза выше, чем в соответствующих образцах одиночных опухолей.

Результаты определения в образцах тканей уровней IL-2 и IL-10 показали отсутствие статистически значимых различий во всех исследованных пробах.

### **Заключение**

Учитывая то, что наблюдалось снижение интратуморального количества CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов и накопление Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), а также что наибольший уровень обнаруженных провоспалительных (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1RA) и противовоспалительных цитокинов (IL-2, IL-10) был в тканях опухоли, можно предположить, что на фоне злокачественного процесса в толстой кишке происходят нарушения локального клеточного иммунитета, связанные с дисбалансом субпопуляций лимфоцитов. Кроме того, по показателям цитокинов можно предположить способность опухолевых клеток к аутокринной продукции провоспалительных цитокинов. Найденные изменения свидетельствуют о важной роли тканевых иммунно-воспалительных реакций в патогенезе одиночного и первично-множественного синхронного рака толстой кишки.

### **Список литературы**

1. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. – Киев : Наукова Думка, 2005. – 792 с.
2. Галактионов В.Г. Иммунология. – М. : Изд-во МГУ, 1998. – С. 110, 352.
3. Казубская Т.П. и соавт. Клинико-генетический анализ первично-множественных злокачественных новообразований // Рос. онкологический журнал. – 2007. – № 2. – С. 4-9.
4. Ковальчук Л.В. Клиническая иммунология и аллергология. – М. : Гэотар-Медиа, 2011. – С. 63-67.
5. Симбирцев А.С. Цитокины в иммуногенезе и лечении аллергии // Рос. аллергологический журнал. – 2007. – № 1. – С. 5-19.
6. Хайтов Р.М. Иммунология. – М. : Гэотар Медиа, 2011. – С. 43-44, 72-74.
7. Чиссов В.И. Онкология. – М. : Гэотар-Медиа, 2007. – 544 с.
8. Филлипс Р. Колоректальная хирургия. – М. : Гэотар-Медиа, 2009. – С. 86.
9. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М. : Медицина, 1999. – 409 с.

### **Рецензенты**

Каймакчи О.Ю., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.

Николаева Н.В., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.