

ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ

**Пржедецкий Ю.В., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Шарай Е.А., Позднякова В.В.,
Комарова Е.Ф., Загора Г.И., Бахтин А.В., Селютина О.Н.**

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт», Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия (344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63), e-mail: rnioi@list.ru

Известно, что особенности микроокружения злокачественной опухоли могут влиять на ее инвазию и прогрессирование. Несмотря на то, что БКР принято считать протекающим благоприятно, в последнее время стали встречаться варианты агрессивного течения. Задачей работы является сравнительная характеристика факторов локального иммунитета в микроокружении БКР с различной распространенностью и при различных возрастных особенностях больных. Установлен ряд различий по содержанию факторов локального иммунитета у больных БКР. Показаны более высокие уровни провоспалительных цитокинов, преимущественно IL-1 и IL-8, в опухоли по сравнению с непораженной тканью, а также более высокое количество CD3+CD4+ и более низкое CD3+CD8+ в перитуморальной зоне по сравнению со здоровой тканью, при этом ткань опухоли содержит больше В-клеток. Выявлены некоторые различия, связанные с распространенностью БКР, а также возрастом больных.

Ключевые слова: базальноклеточный рак кожи, перитуморальная зона, локальный иммунитет, возраст.

IMMUNOLOGICAL MICROENVIRONMENT OF BASAL CELL SKIN CANCER

**Przhedetsky Y.V., Zlatnik E.Y., Novikova I.A., Sharay E.A., Pozdnyakova V.V.,
Komarova E.F., Zakora G.I., Bakhtin A.V., Selutina O.N.**

FSBI "Rostov research institute of oncology" of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russia (63 14 Liniya Str., Rostov-on-Don, 344037), e-mail: rnioi@list.ru

It is known that particularities of microenvironment of a malignant tumor can influence its invasion and progress. Although BCSC is commonly believed to have a favourable prognosis, variants of aggressive disease course have been encountered lately. The task of this paper is comparative characteristics of factors of the local immunity in microenvironment of BCSC with various proliferation and under varied age particularities of patients. A number of distinctions according to content of local immunity factors in BCSC patients have been determined. Higher levels of proinflammatory cytokines, mostly IL-1 and IL-8, are shown in the tumor as compared to intact tissue; there is also a higher quantity of CD3+CD4+ and a lower quantity of CD3+CD8+ in the peritumoral area as compared to healthy tissue, with the tumor tissue containing more B-cells. Some differences have been found related to the proliferation of BCSC as well as to the age of the patients.

Keywords: basal cell skin cancer, peritumoral area, local immunity, age.

Кожа является барьерным органом, в котором представлены клеточные и гуморальные факторы врожденного и адаптивного иммунитета. В современной литературе кожа рассматривается как орган иммуногенеза из-за присутствия в ней различных популяций иммунокомпетентных клеток: Т-, В-лимфоциты, НК- и дендритные клетки, столь значимые для развития иммунного ответа [1]. Многие авторы относят к иммунной системе кожи и кератиноциты, т.к. они продуцируют широкий спектр регуляторных молекул (ростовых факторов, цитокинов), чем обусловлено их участие в иммунной защите кожи. В коже обнаружено большинство известных интерлейкинов, нарушение продукции которых лежит в основе патогенеза ряда кожных заболеваний, в частности псориаза и атопического дерматита [2].

В настоящее время показана роль иммунной системы в противоопухолевом ответе организма [3,4]. При этом основная функция принадлежит клеточному иммунитету, опосредованному естественными киллерными клетками и специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами. Куртасова Л.М. и соавторы [6] обнаружили у больных базальноклеточным раком кожи изменения иммунофенотипического спектра лимфоцитов периферической крови. У данной категории пациентов наблюдается понижение количества зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), повышается содержание CD16+ клеток, увеличивается число клеток, экспрессирующих маркер поздней активации (HLA-DR+). Имеются данные по выявлению в опухолях БКР и в окружающих ее тканях маркеров CD4, CD8, CD68. Выявлена вариабельность количественной и качественной характеристики клеточного инфильтрата в различных гистотипах. Установлена максимальная выраженность клеточной реакции в поверхностно-распространяющейся форме и минимальная интенсивность в инфильтративной [9].

Молочков В.А. и соавторы [7] указывают на важную роль цитокинов в канцерогенезе некоторых опухолей кожи (меланома, плоскоклеточный и базальноклеточный раки кожи). К активации пролиферативных процессов в коже приводит провоспалительный цитокин TNF- α (фактор некроза опухоли), способствующий индукции экспрессии молекул внутриклеточной адгезии, миграции активированных иммунокомпетентных клеток и увеличению продукции сосудистого фактора роста [8].

В связи с вышесказанным целью данной работы является сравнительная характеристика факторов локального иммунитета в микроокружении базальноклеточного рака кожи с различной распространенностью и с учетом возраста больных.

Материалы и методы

Исследования проводились у 45 онкологических пациентов обоего пола с первичным базальноклеточным раком кожи T1-4N0M0. Возраст больных колебался от 21 до 86 лет. По частоте встречаемости в зависимости от распространенности опухолевого процесса, оцениваемой согласно классификации злокачественных новообразований кожи AJCC, больные распределялись следующим образом: 21 пациент (46,7 %) с T2N0M0, 12 больных (26,7 %) с T3N0-xM0-x, 10 больных (22,2 %) с T1N0M0 и 2 (4,4 %) с T4N0M0. Удаленные опухоли подвергались патоморфологическому исследованию для подтверждения диагноза. Отдельные фрагменты опухолевой ткани, перитуморальной зоны (визуально неизменной ткани, прилежащей к опухоли) и здоровой кожи, взятой при проведении пластических операций неонкологическим больным (n=15), гомогенизировали с помощью дезагрегирующего устройства BD Medimachine. В гомогенатах определяли популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов на проточном цитометре FACSCantoII (BD) с

панелью антител Т-, В-, NK (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56), а также содержание цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α методом ИФА с тест-системами производства «Вектор-Бест» (Новосибирск) и «Цитокин» (С-Петербург).

Результаты выражали в процентах от общего количества лимфоцитов (для клеток лимфоцитарных субпопуляций) и в пг/мл (для цитокинов), пересчитанных на 1 г белка, количество которого определяли биуретовым методом; таким образом, получали удельное содержание каждого цитокина в исследуемых тканях.

У всех больных было получено добровольное информированное согласие на использование биологического материала для научных исследований. Статистический анализ материала проводился с использованием MicrosoftExcel (Windows XP). Данные представлены в виде $M \pm m$. Разницу отличий оценивали по критерию Стьюдента и считали достоверной при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты представлены в табл. 1–5 и на рис. 1. Табл. 1 и 2 демонстрируют суммарные показатели по всем обследованным больным. Число исследованных образцов перитуморальной области было значительно меньше, чем образцов опухолевой ткани, т.к. их удавалось взять не всегда и в минимальном объеме, особенно при локализации опухоли на лице. Поэтому во многих образцах перитуморальной области цитокины и лимфоциты не были найдены; в таблицах приведены данные только по тем, где они были обнаружены.

Таблица 1

Удельное содержание некоторых провоспалительных цитокинов в опухолевой и непораженной ткани больных БКР

| Образцы тканей | Уровни цитокинов (пг/мл/г белка) | | | | |
|----------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|---------------|
| | IL-1 β | IL-6 | IL-8 | IL-18 | TNF- α |
| Опухоль (n=45) | 48,8 \pm 8,5* | 13,5 \pm 2,2 | 50,0 \pm 6,5* | 164,8 \pm 32,1** | 2,4 \pm 0,4 |
| Перитуморальная зона (n=5) | 67,9 \pm 32,2 | 26,8 \pm 17,1 | 48,8 \pm 15,0 | 311,2 \pm 32,3 | 2,1 \pm 0,4 |
| Здоровая ткань (n=12) | 15,7 \pm 6,3 | 18,5 \pm 10,8 | 17,2 \pm 7,6 | 257,1 \pm 66,5 | 1,7 \pm 0,2 |

Примечание. * – статистически достоверные отличия от показателя здоровой ткани; ** – статистически достоверные отличия от показателя ткани перитуморальной зоны ($p < 0,05$).

Как видно из табл. 1, в опухоли содержится статистически значимо более высокое количество IL-1 β и IL-8, по TNF- α и IL-6 различий не выявлено, а уровень IL-18, в ткани БКР оказался ниже по сравнению с тканью перитуморальной области, но не имел статистически достоверных отличий от показателя здоровой ткани.

Таблица 2

Субпопуляционный состав лимфоцитов в опухолевой и непораженной ткани больных БКР

| Образцы тканей | Субпопуляции лимфоцитов (%) | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|-----------|------------|----------|----------|
| | CD3+ | CD3+CD4+ | CD3+CD8+ | CD19+ | CD16/56+ |
| Опухоль (n=30) | 90,5±1,3 | 58,6±2,0 | 28,6±1,8** | 4,4±0,2* | 2,5±0,5 |
| Перитуморальная зона (n=5) | 93,5±1,9 | 69,3±7,2* | 16,4±7,0* | 2,5±1,6 | 1,8±0,7 |
| Здоровая ткань (n=15) | 89,5±3,6 | 53,6±3,0 | 36,1±5,8 | 0,7±0,3 | 7,1±2,8 |

Примечание. * – статистически достоверные отличия от показателя здоровой ткани; ** – статистически достоверные отличия от показателя ткани перитуморальной зоны ($p < 0,05$).

Уровни субпопуляций лимфоцитов продемонстрировали ряд различий между тканью опухоли, перитуморальной области и здоровой тканью (табл. 2). Так, содержание CD3+CD4+ клеток оказалось максимальным в ткани перитуморальной зоны, статистически достоверно превышая показатель здоровой ткани. Уровень CD3+CD8+ лимфоцитов, напротив, был в ней минимальным из всех исследуемых образцов. Содержание CD19+ клеток достигало наивысшего значения в опухолевой ткани. Количество CD16/56+ лимфоцитов в образцах опухоли и перитуморальной зоны было ниже, чем в непораженной коже, однако, широкая индивидуальная вариабельность данных не позволяет считать эти различия статистически значимыми. Следует отметить, что в 9 из 14 исследованных образцов здоровой кожи лимфоцитов не было обнаружено, в табл. 2 приведены данные по 5 образцам, где лимфоциты были найдены в количестве, необходимом для выполнения проточной цитофлюориметрии.

При разделении общей группы больных в зависимости от возраста были показаны некоторые особенности исследованных показателей у больных различных возрастных групп. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Удельное содержание некоторых провоспалительных цитокинов в опухолевой и непораженной ткани больных БКР у больных различных возрастных групп

| Образцы тканей | Возраст больных (годы) | Уровни цитокинов (пг/мл/г белка) | | | |
|----------------|------------------------|----------------------------------|-----------|------------|---------------|
| | | IL-1 β | IL-6 | IL-8 | TNF- α |
| Опухоль | 29-50 (n=4) | 75,3±19,1* | 17,4±8,8 | 56,1±15,9* | 2,4±0,6 |
| | 50-70 (n=10) | 25,7±6,2** | 16,3±4,7* | 44,5±10,9* | 2,5±0,87 |
| | 71-85 (n=18) | 39,4±5,6* ** | 10,9±2,8 | 41,5±4,6* | 2,3±0,5 |

| | | | | | |
|-------------------|--------------|-----------|-----------|----------|---------|
| Здоровая ткань | 29-50 (n=4) | 3,8±1,0 | 1,4±0,5 | 7,2±5,3 | 1,8±0,5 |
| | 50-70 (n=10) | 24,7±18,5 | 4,5±3,9 | 1,2±0,1 | 1,5±0,2 |
| | 71-85 (n=18) | 10,1±7,1 | 23,9±16,1 | 14,1±6,6 | 2,1±0,3 |

Примечание. * – статистически достоверные отличия от показателей здоровой ткани; ** – статистически достоверные отличия от показателей младшей возрастной группы ($p<0,05$).

Как видно из табл.3, наблюдается статистически достоверно более высокое содержание IL-1 β в опухолевой ткани больных в возрасте до 50 лет по сравнению с остальными возрастными категориями. Для IL-8 подобные отличия отмечались в виде тенденции. В образцах больных всех возрастных групп показаны статистически достоверно более высокое содержание IL-8 в опухоли, чем в непораженной коже, для IL-1 β такие отличия были выявлены в образцах младшей и старшей возрастных групп, а в средней группе в опухоли оказался выше уровень IL-6. Уровни TNF- α не имел статистически значимых различий ни между возрастными группами, ни между тканью опухоли и немалигнизированных образцов по каждой из возрастных групп. Значительная индивидуальная вариабельность данных была отмечена не только в ткани опухоли, но и в здоровой коже.

Следует отметить, что при сравнении показателей цитокинового состава здоровой кожи отмечены различия между разными возрастными группами: так, у больных в возрасте до 50 лет отмечен максимальный уровень IL-18 (499±36,2 против 219,7±88,2 у больных в возрасте 50–70 лет и 162,7±39,1 у больных старшей возрастной группы; по сравнению с обеими группами различия статистически достоверны, ($p<0,05$). Наблюдалось также более высокое содержание IL-1 β и IL-6 IL-8 у больных старше 50 лет по сравнению с больными младше 50 лет, однако, из-за значительной вариабельности индивидуальных данных статистически достоверных различий между ними выявить не удалось.

Таблица 4

Субпопуляционный состав лимфоцитов в опухолевой ткани больных БКР у больных различных возрастных групп

| Возраст больных (годы) | Субпопуляции лимфоцитов (%) | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|----------|----------|
| | CD3+ | CD3+CD4+ | CD3+CD8+ | CD19+ | CD16/56+ |
| 29-50 (n=4) | 92,8±2,5 | 56,7±5,3 | 35,2±5,5* | 1,2±0,7* | 5,5±4,1 |
| 50-70 (n=10) | 92,3±1,2 | 65,0±3,2* | 23,3±3,8* | 2,8±0,88 | 2,23±0,5 |
| 71-85 (n=18) | 89,3±2,0 | 55,5±2,6* | 29,0±1,9 | 5,9±1,9* | 1,7±0,4 |

Примечание. * – статистически достоверные различия между возрастными группами ($p<0,05$).

Сравнение тканевого содержания лимфоцитов различных субпопуляций у больных разных возрастных групп показало, что уровень CD3+CD4+ был максимальным в средней возрастной группе, статистически достоверно превышая обнаруженный у больных старше 70 лет (табл. 4). Содержание CD3+CD8+ лимфоцитов, напротив, было в средней возрастной группе минимальным и оказалось статистически значимо ниже, чем у больных младшей группы. Выявлен наиболее высокий процент В-лимфоцитов в ткани БКР старшей возрастной группы и минимальный – в младшей. Содержание НК-клеток, хотя и было в младшей группе выше, чем в остальных, статистически достоверных различий между ними обнаружить не удалось.

Результаты сравнительного определения данных показателей в опухолевой и немалигнизированной ткани представляется возможным продемонстрировать только по одной возрастной группе, а именно – средней (рис. 1).

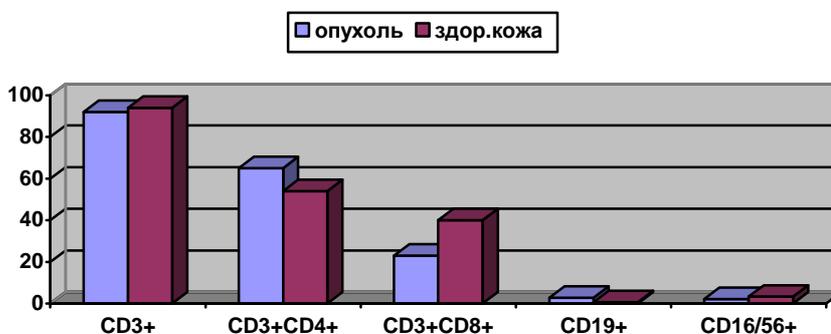


Рис. 1. Субпопуляционный состав лимфоцитов в опухолевой и непораженной ткани больных БКР у больных различных возрастной группы 50–70 лет

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что в опухоли больных данной группы выявлены статистически значимо более высокое содержание CD3+CD8+ лимфоцитов и более низкое количество CD3+CD4+ клеток, чем в образцах здоровой кожи больных соответствующего возраста. Эти результаты несколько отличаются от полученных без разделения на возрастные группы (табл. 2).

Кроме возрастного разделения было проведено разделение больных БКР в зависимости от распространенности процесса по классификации TNM. Полученные данные представлены в табл. 5.

Таблица 5

Удельное содержание некоторых провоспалительных цитокинов в опухолевой ткани больных БКР у больных с различной распространенностью опухоли

| Стадия | Уровни цитокинов (пг/мл/г белка) | | | |
|--------|----------------------------------|------|------|-------|
| | IL-1β | IL-6 | IL-8 | TNF-α |
| | | | | |

| | | | | |
|--------|-----------|----------|------------|-----------|
| T1N0M0 | 57,6±22,2 | 18,1±6,3 | 45,7±11,6 | 2,4±0,5* |
| T2N0M0 | 41,3±7,3 | 8,7±3,1 | 39,9±5,7 * | 6,8±4,6 |
| T3N0M0 | 40,2±7,8 | 17,2±4,4 | 38,1±6,7 * | 2,8±0,8 * |
| T4N0M0 | 52,0±24,0 | 13,5±4,0 | 67,1±5,5 | 1,2±0,05 |

Примечание. * – статистически достоверные отличия от показателей стадии T4N0M0; (p<0,05).

Как видно из табл. 5, при наиболее распространенной БКР в ее ткани определяются более высокие уровни IL-8 и меньшие TNF-α, что может характеризовать микроокружение опухоли как неблагоприятное в плане дальнейшей диссеминации. Хемокин IL-8 способствует адгезии и инвазии опухолевых клеток, а минимальное значение TNF-α предполагает дистантное влияние опухоли, приводящее к истощению цитотоксического потенциала ткани при стадии T4.

Итак, установлен ряд различий по содержанию факторов локального иммунитета у больных БКР. Показаны более высокие уровни провоспалительных цитокинов, преимущественно IL-1 и IL-8, в опухоли по сравнению с непораженной тканью, а также более высокое количество CD3+CD4+ и более низкое CD3+CD8+ в перитуморальной зоне по сравнению со здоровой тканью, при этом ткань опухоли содержит больше В-клеток. Выявлены некоторые различия, связанные с распространенностью БКР, а также возрастом больных.

Список литературы

1. Боровик Т. Э., Макарова С. Г., Дарчия С. Н., Гамалева А. В., Грибакин С. Г. Кожа как орган иммунной системы // Педиатрия. – 2010. – № 2. – С.10-18.
2. Катунина О.Р., Резайкина А.В. Провоспалительные цитокины ИЛ-1 и ФНО-α в очагах пораженной кожи больных псориазом // Vestn Dermatol Venerol. – 2011. – № 4. – С. 25-30.
3. Кит О.И., Златник Е.Ю., Никипелова Е.А., Геворкян Ю.А., Аверкин М.А., Новикова И.А., Дашков А.В. Особенности общего и локального иммунитета при одиночном и синхронном первично-множественном раке толстой кишки // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5. – С.58.
4. Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Никипелова Е.А., Новикова И.А. Местный клеточный иммунитет при аденокарциноме и полипах толстой кишки // Сибирское медицинское обозрение. – 2012. – Т.76. – № 4. – С.11-16.

5. Козлов В.А., Черных Е.Р. Современные проблемы иммунотерапии в онкологии // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – № 2. – С. 13-14.
6. Куртасова Л.М. , Арутюнян Г.А., Шкапова Е.А., Побилат А.Е. Иммунологические показатели и функционально- метаболическая активность нейтрофилов крови у больных базальноклеточным раком кожи // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 6. – С. 561-565.
7. Молочков В.А., Лезвинская Е.М., Молочков А.В. Цитокины в генезе опухолей кожи // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2003. – № 3. – С.92-100.
8. Снарская Е. С., Сучков С. В. Иммунологические аспекты патогенеза базалиом // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2004. – № 2. – С.4-9.
9. Чупров И.Н. Иммуногистохимическая характеристика базально-клеточного рака кожи // Библиотека патологоанатома. – Санкт-Петербург, 2013.

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.