

ФАКТОРЫ ЛОКАЛЬНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

Златник Е.Ю.¹, Бахтин А.В.¹, Кочуев С.С.¹, Новикова И.А.¹, Селютина О.Н.¹,
Непомнящая Е.М.¹, Пржедецкий Ю.В.¹, Позднякова В.В.¹, Захарова Н.А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Изучали состояние локального клеточного иммунитета у 30 больных меланомой кожи с различной глубиной инвазии. Использовали метод проточной цитофлюориметрии с подсчетом лимфоцитов различных субпопуляций в гомогенатах опухолевой ткани и перитуморальной области. Полученные результаты показывают более высокий уровень Т-лимфоцитов (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, T-regs) в опухолевой ткани, наряду с более низким содержанием в ней В- и NK-клеток по сравнению с кровью. Популяционный состав лимфоцитов перитуморальной области частично схож с составом опухолевой ткани, однако накопление в ней CD3+CD4+ не сопровождается столь высоким уровнем их минорной субпопуляции (T-regs), как в ткани меланомы, что позволяет предположить избирательность миграции последних в опухолевую ткань. Более глубокая инвазия меланомы сопровождается низким уровнем Т- и высоким уровнем NK-клеток в ткани опухоли.

Ключевые слова: меланома кожи, глубина инвазии, локальный клеточный иммунитет, T-regs.

FACTORS OF LOCAL CELLULAR IMMUNITY IN SKIN MELANOMA

Zlatnik E.Y.¹, Bakhtin A.V.¹, Kochuev S.S.¹, Novikova I.A.¹, Selyutina O.N.¹,
Nepomnyashchaya E.M.¹, Przhedetsky Y.V.¹, Pozdnyakova V.V.¹, Zakharova N.A.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: kochuev7@yandex.ru

Local cellular immunity in 30 patients with melanoma of different invasion depths was studied by flow cytometry with calculation of lymphocytes of different subpopulations in tumor tissue homogenates and peritumoral area. The results show a higher level of T-lymphocytes (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ and T-regs) in tumor tissue, along with lower levels of B- and NK-cells in comparison with the blood. Population structure of lymphocytes in peritumoral area is partially similar to that in tumor tissue, but accumulation of CD3+CD4+ is not accompanied by such a high level of their minor subpopulation (T-regs) as in melanoma tissue, which allows suggesting a selective migration of the latter to tumor tissue. The deeper melanoma invasion is accompanied by a lower level of T-cells and a higher level of NK-cells in tumor tissue.

Keywords: skin melanoma, invasion depth, local cellular immunity, T-regs.

Меланома кожи является одной из наиболее неблагоприятно протекающих и плохо поддающихся лечению злокачественных опухолей. При этом от многих других опухолей ее отличает доказанная иммуногенность вследствие экспрессии различных, в частности раково-тестикулярных антигенов, которые изучены и описаны в литературе [9]. Особенности инфильтрации опухоли лимфоцитами, макрофагами, плазматическими клетками, оценка ее роли в прогрессии или регрессии опухоли, ее возможное прогностическое значение привлекают внимание ряда авторов [1]. Характеристика иммунологического микроокружения рассматривается как важный прогностический признак при иммунотерапии меланомы [3; 6]. В аспекте взаимодействия опухоли и организма опухоленосителя представляет особый интерес состояние перитуморальной области меланомы [4; 10].

Основными критериями при установлении стадии и расчете прогноза заболевания являются такие морфологические характеристики меланомы, как глубина инвазии по Кларку и толщина опухоли по Бреслоу. Первый критерий определяет уровень распространения злокачественного процесса в нижележащие слои дермы и основан на анатомическом строении кожи. Толщина опухоли по Бреслоу характеризует наибольший вертикальный размер меланомы в миллиметрах.

Целью данной работы является исследование особенностей лимфоцитарного состава опухолевой ткани и перитуморальной области меланомы кожи с различной толщиной опухоли по Бреслоу и глубиной инвазии по Кларку.

Материалы и методы

Объектом изучения были фрагменты ткани опухоли и перитуморальной области, а также кровь 30 пациентов с меланомой кожи (18 женщин и 12 мужчин в возрасте от 31 до 82 лет), госпитализированных в отделение опухолей кожи, мягких тканей и молочной железы № 2 Ростовского научно-исследовательского онкологического института с октября 2014 по июль 2015 г. У 3 больных патологический очаг локализовался на верхних конечностях, у 11 на нижних, у 2 на волосистой части головы, у 12 на туловище, у 2 на лице. По морфологической форме преобладала узловая меланома с толщиной от 1 до 15 мм по Бреслоу и II-V уровнем инвазии по Кларку. Одна пациентка имела отдаленные метастазы в легкие, у четверых больных установлено метастатическое поражение регионарного коллектора. Все случаи заболевания были первичными, неoadъювантного лечения не проводилось. Больным было выполнено хирургическое лечение в объеме широкого иссечения опухоли с пластикой местными тканями (15), свободным кожным лоскутом (10), встречными кожно-жировыми лоскутами (1), ротационным кожно-жировым лоскутом (3), серповидным кожно-жировым лоскутом (1). Пациентам с наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах дополнительно проводилась лимфодиссекция. Исследование факторов общего и локального клеточного иммунитета проводили не позднее, чем через час после хирургического лечения на свежем послеоперационном материале и крови, взятой перед проведением операции. Кровь у больных брали из локтевой вены в пробирку с антикоагулянтом (ЭДТА). Удаленные опухоли подвергались патоморфологическому исследованию; кроме того, отдельные фрагменты опухолевой ткани и перитуморальной зоны (ПЗ, визуально неизменной ткани, прилежащей к опухоли) гомогенизировали с помощью дезагрегирующего устройства BD Medimachine. В крови и в гомогенатах тканей определяли популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов на проточном цитометре FACSCantoII (BD) с панелью антител T-, B-, NK (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56), дополнительно изучали количественное содержание T-регуляторных

(T-regs) клеток (CD4+CD25+CD127dim). Несмотря на то что наиболее распространенным методом определения последних является подсчет клеток с фенотипом CD4+CD25brightFoxP3+, в литературе есть данные о приемлемости для этой цели фенотипа CD4+CD25+CD127dim [2; 7].

Результаты выражали в процентах от общего количества лимфоцитов, а для T-regs в процентах от CD3+CD4+ клеток. Статистическую обработку данных выполняли с помощью параметрических и непараметрических методов (t-критерий Стьюдента, критерий Уилкоксона, метод непрямых разностей).

Результаты

Результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов крови, опухоли и перитуморальной зоны по всей группе больных представлены в табл. 1 и на рис. 1. Следует отметить, что не у всех больных в тканевых образцах были выявлены лимфоциты в количестве, достаточном для проточной цитофлуориметрии. Так, из 30 образцов опухолей лимфоциты были обнаружены в 23, а в перитуморальной области – только в 13 образцах.

Таблица 1

Сравнительная характеристика субпопуляционного состава лимфоцитов крови, опухоли и перитуморальной зоны при меланоме кожи (%)

Лимфоциты	Образцы тканей		
	Опухоль (n=23)	Перитуморальная зона (n=13)	Кровь (n=30)
CD3+	89,1±1,8* **	81,9±2,5*	69,3±2,36
CD3+CD4+	43,0±2,4 **	51,9±3,9*	42,7±2,1
CD3+CD8+	37,8±2,6* **	22,7±2,0	22,8±1,4
CD19+	2,9±0,46*	2,6±0,73*	10,7±0,94
CD16/56+	5,7±1,6* **	12,4±2,7	17,7±1,7
T-regs от CD4+	18,6±2,4* **	10,1±2,2	6,73±0,27

Примечание. * - статистически достоверные отличия от показателей крови; ** - статистически достоверные отличия от показателей перитуморальной зоны (p<0,05).

Как видно из табл. 1, наблюдается ряд различий лимфоцитарного состава опухоли и ее окружения от соответствующих показателей крови. Так, уровень T-лимфоцитов в опухоли статистически достоверно выше, чем в крови, за счет CD3+CD8+ клеток, а содержание B- и NK-лимфоцитов – ниже. В опухоли отмечено накопление T-regs, количество которых в процентах от CD3+CD4+ клеток оказалось в 3 раза выше, чем в крови, хотя по общему уровню CD3+CD4+ лимфоцитов кровь и опухолевая ткань не имели статистически достоверных различий.

Состав лимфоцитарных популяций и субпопуляций ткани перитуморальной зоны

демонстрирует ряд отличий от показателей как крови, так и опухолевой ткани (табл. 1, рис. 1). По сравнению с кровью в ней выявлено статистически значимо больше CD3+ клеток за счет CD3+CD4+ и меньше B-(CD19+) лимфоцитов. По сравнению с тканью опухоли перитуморальная область содержит меньше CD3+ и CD3+CD8+ лимфоцитов, а также T-regs на фоне более высокого уровня CD3+CD4+ клеток. В перитуморальной зоне выявлено также статистически достоверно более высокое содержание CD16/56+ клеток, чем в опухоли: происходит постепенное снижение их уровня от периферической крови через перитуморальную зону к ткани опухоли, причем такая направленность противоположна наблюдаемой для T-regs (рис. 1).

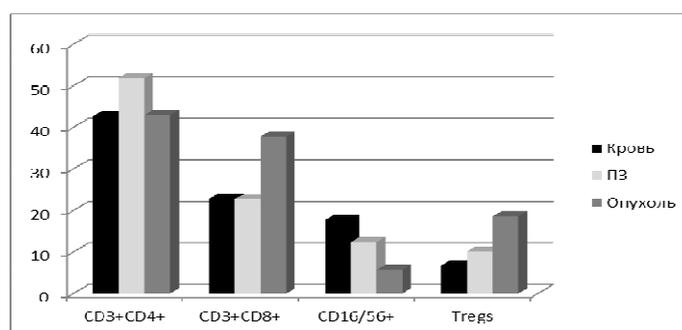


Рис. 1. Процентное содержание лимфоцитов некоторых субпопуляций в крови и в тканях меланомы и ее перитуморальной области

Для анализа показателей иммунного статуса у больных с различным уровнем инвазии меланомы по Бреслоу были выделены 3 группы больных: с инвазией 1-3, 3-10 и больше 10 мм. Сравнительная характеристика их иммунологических показателей приведена в табл. 2, на рис. 2.

Таблица 2

Показатели общего и локального иммунитета у больных меланомой кожи при разной толщине опухоли по Бреслоу (%)

Лимфоциты	Толщина опухоли, образцы тканей								
	1-3 мм (n=9)			3-10 мм (n=15)			Больше 10 мм (n=6)		
	опухоль	ПЗ	кровь	опухоль	ПЗ	кровь	опухоль	ПЗ	кровь
CD3+	94,9± 0,7* **●	88,9± 0,7*°	65,9± 5,1	90± 1,5*●	81,1 ±5,5	72± 3,4	80,0± 5,9●	76,4± 2,8°	69,2± 3,9
CD3+ CD4+	48± 5,2	61,1± 5,2*°	37,8± 3,4	43,5± 2,9	53± 8,3	42,5± 3,5	36,6± 5,5* **	47,1± 5,2°	45,2± 3,4
CD3+ CD8+	39,9± 4,6* **	21,6± 3,6	24,8± 2,7	38,2± 3,2* **	22,1 ±3,0	22,1± 2,1	38,3± 8,6*	21,1± 3,9	19,2± 2,0
CD16/ 56+	1,4± 2,3*●	4,4± 2,3*°	16,8± 2,9	4,1± 1,0*●	13,5 ±5,3	18,1± 3,1	12,8± 5,3●	18,6± 3,3°	17,5± 1,9
CD19+	1,3±	3,5±	12,0±	3,9±	2,7±	9,2±	2,1±	1,6±	12,2±

	0,6*•	2,8*	2,8	0,7*•	1,1*	1,0	0,3*	0,7*	2,7
T-regs от	12,4±	11,9±	7,2±	21,3±	5,5±	6,4±	19,6±	14,0±	6,4±
CD4+	3,2	5,6	0,5	3,5*	1,9	0,5	5,2*	5,1	0,4

Примечание. * - статистически достоверные отличия от показателей крови; ** - статистически достоверные отличия от показателей перитуморальной зоны; • - статистически достоверные различия между группами (опухоль); ° - статистически достоверные различия между группами (перитуморальная зона) (p<0,05).

Как видно из табл. 2, не наблюдается статистически достоверных различий исследуемых показателей в крови, кроме уровня лимфоцитов, который был выше при минимальной глубине инвазии опухоли (30,9±2,3, 23,7±1,5 и 21,9±2,6% соответственно; p<0,05).

В ткани опухоли и перитуморальной зоны обнаружены различия: при нарастании инвазии уменьшается количество Т-лимфоцитов и повышается содержание НК-клеток. Различия по уровню Т-regs в опухоли статистически недостоверны, но выявлена тенденция к их более высокому содержанию в опухолях с более глубокой инвазией. При инвазии 1-3 мм 4 из исследованных показателей в опухолевой ткани отличаются от крови: содержание Т-лимфоцитов, в частности CD3+CD8+, было выше, а уровни CD16/56+ и CD19+ ниже, чем в крови. При инвазии 3-10 мм к аналогичным различиям добавляется статистически значимо более высокое по сравнению с кровью содержание Т-regs, а максимальная глубина инвазии сопровождается более низким уровнем в опухолевой ткани CD3+CD4+ лимфоцитов при высоком проценте Т-regs; количество НК-клеток не отличается от показателя крови. Подобные различия прослеживаются и в перитуморальной зоне: так, при минимальной инвазии в ней содержится статистически достоверно больше CD3+ и CD3+CD4+ лимфоцитов и меньше НК-клеток, чем при меланоме с инвазией свыше 10 мм (табл. 2).

При сравнении факторов локального иммунитета у больных с различной инвазией по Кларку выявлены подобные закономерности: в опухоли находится больше Т-клеток, чем в крови, преимущественно за счет CD3+CD8+ и Т-regs, и меньше CD19+ и CD16/56+ (табл. 3). В перитуморальной зоне отмечено повышение уровней CD3+CD4+ лимфоцитов по сравнению с кровью, хотя не во всех группах статистически достоверно подтвержденное.

Таблица 3

Показатели общего и локального иммунитета у больных меланомой кожи при разной глубине инвазии опухоли по Кларку (%)

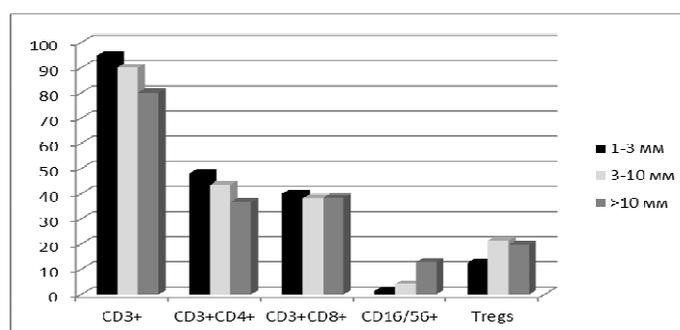
Лимфоциты	Глубина инвазии, образцы тканей								
	III (n=15)			IV (n=8)			V (n=4)		
	опухоль	ПЗ	кровь	опухоль	ПЗ	кровь	опухоль	ПЗ	кровь
CD3+	90,7± 1,6*	84,3± 3,6*	67,2± 3,1°	92,9± 1,0*	82± 7,6	78,7± 1,9°	77,4± 6,9	75,2± 3,6	67,8± 4,7°

CD3+ CD4+	49,4± 2,8•	56,7± 5,9*	42,3± 3,4	34,9± 2,6*•	50,9± 10,6	44,9± 2,4	39,0± 4,3•	47,9± 7,2	39,0± 6,3
CD3+ CD8+	35,5± 3,0* **•	22,6± 2,9	20,5± 1,6 ^o	47,3± 3,7* **•	19,4± 1,1*	28,3± 2,8 ^o	33,3± 9,1	22,0± 5,3	18,1± 2,1 ^o
CD16/ 56+	3,9± 1,0*•	9,2± 4,0*	21,4± 2,8 ^o	2,1± 0,6*	13,5± 6,5	11,3± 1,5 ^o	16,4± 5,5•	19,7± 4,4	18,1± 2,1 ^o
CD19+	3,1± 0,6*	3,4± 1,5*	10,6± 1,5	2,7± 1,1*	1,3± 0,9*	9,4± 0,9	2,3± 0,3*	2,1± 0,7*	12,6± 3,4
T-regs от CD4+	20,6± 3,4* **	9,33± 2,9	7,0± 0,3	14,1± 3,5	9,2± 5,6	6,1± 0,3	20,6± 6,7*	11,9± 6,5	6,8± 0,4

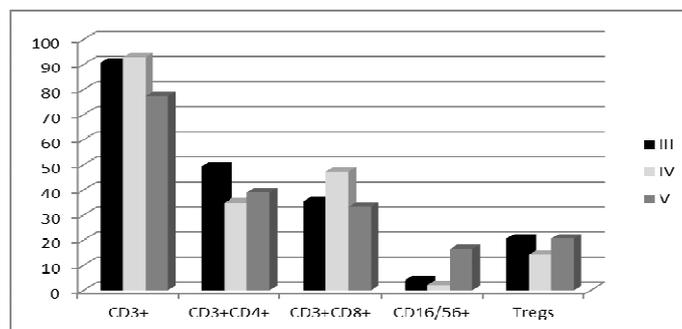
Примечание. * - статистически достоверные отличия от показателей крови; ** - статистически достоверные отличия от показателей перитуморальной зоны; • - статистически достоверные различия между группами (опухоль); ^o - статистически достоверные различия между группами (кровь) (p<0,05).

Отмечен ряд различий между группами в зависимости от степени инвазии по Кларку: при III степени в опухоли наблюдался более высокий уровень CD3+CD4+ лимфоцитов по сравнению с IV и V степенью, а уровень CD3+CD8+ клеток был максимальным в опухолях с IV степенью инвазии. Сходная картина наблюдалась и в крови: у больных с IV степенью инвазии содержание CD3+CD8+ было статистически значимо выше, а CD3+CD4+ ниже, чем при III степени инвазии; однако при инвазии V степени не наблюдалось отличий от III (табл. 3).

На рис. 2 представлено сравнение исследованных факторов локального клеточного иммунитета в ткани меланомы кожи с различной глубиной инвазии по Бреслоу и по Кларку: показаны как сходные закономерности, так и различия.



А



Б

Рис. 2. Процентное содержание лимфоцитов некоторых субпопуляций в ткани меланомы при различной толщине опухоли по Breslow (А) и глубине инвазии по Кларку (Б)

Так, при более глубокой инвазии опухоли по обоим критериям отмечено снижение уровня CD3+ и CD3+CD4+ клеток и повышение содержания CD16/56+ лимфоцитов. При этом наблюдались разноречивые данные по количеству CD3+CD8+ клеток, демонстрирующему различия только при сравнении опухолей с различной глубиной инвазии по Кларку и по T-regs, содержание которых было высоким вне зависимости от ее нарастания (рис. 2Б).

При сопоставлении иммунологических показателей в ткани поверхностных и узловых форм меланомы кожи также выявлен ряд различий, менее выраженных для крови, чем для опухолевой ткани. Так, в крови отмечено статистически достоверно более высокое количество лимфоцитов у больных с поверхностной формой меланомы кожи, чем с узловой (33,3±2,8 и 23,6±1,2% соответственно; p<0,05). В ткани опухоли у тех же больных выявлено по сравнению с узловой формой меланомы более высокое содержание Т-лимфоцитов (93,6±0,9 и 88,1±2,1% соответственно) и более низкое НК-клеток (0,9±0,1 и 6,4±1,8% соответственно), а также T-regs (10,6±3,3 и 19,8±2,5% соответственно); для данных показателей различия статистически достоверны (p<0,05) (рис. 3).

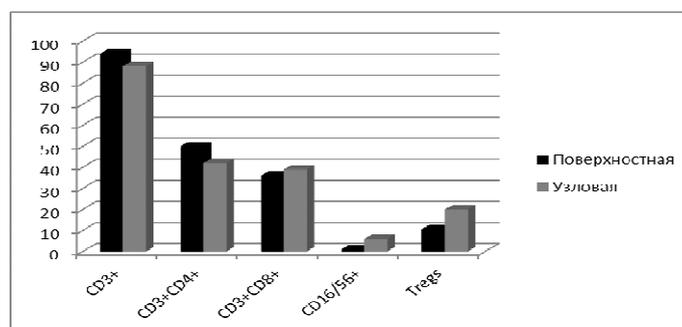


Рис. 3. Процентное содержание лимфоцитов некоторых субпопуляций в ткани меланомы при ее различных формах

Итак, в опухолевой ткани меланомы кожи присутствуют Т-лимфоциты обеих основных субпопуляций, потенциально обладающие способностью к распознаванию антигенов, продукции цитокинов, а также цитотоксичостью (CD3+CD4+ и CD3+CD8+); однако их наличие не реализуется в виде противоопухолевого действия. Причина этого, по-видимому, состоит в том, что, несмотря сходное процентное содержание CD3+CD4+ клеток в крови и в ткани меланомы, уровень их минорной субпопуляции Т-regs в последней значительно выше, тогда как CD3+CD4+ концентрируются в перитуморальной области. Можно предположить избирательность миграции Т-regs в опухолевую ткань вследствие взаимодействия их мембранных рецепторов с хемокинами, что описано в литературе на примере рака яичника [5] и желудка [8]. Неожиданной находкой явился низкий уровень НК-клеток в ткани меланомы с меньшей глубиной инвазии и его повышение при более глубоком прорастании. Однако с учетом значительного уровня в ней Т-regs и данных литературы об их ингибирующем действии в отношении естественных киллеров [2], можно предположить, что их присутствие в опухоли препятствует проявлению цитолитической активности последних.

Список литературы

1. Данилова А.Б., Данилов А.О., Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Комаров Ю.И. Предиктивное значение изменения экспрессии опухолеассоциированных антигенов и продукции иммуносупрессирующих факторов опухолевыми клетками в процессе культивирования и создания противоопухолевых вакцин // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59. — Приложение к № 3. — С. 1160—1161.
2. Палкина Н.В., Швецова Ю.И., Кириченко А.К., Рукша Т.Г. Ингибирование матриксных металлопротеиназ 9-го и 13-го типов влияет на выраженность лимфоцитарной инфильтрации и уровни экспрессии микроРНК miR-21 и miR-let-7b в клетках меланомы *in vivo* // Архив патологии. - 2015. - N 1. - С. 41-47.
3. Селькова М.С., Селютин А.В., Сельков С.А. Особенности содержания Т-регуляторных лимфоцитов и НК-клеток у пациентов с хроническим гепатитом С // Инфекции и иммунитет. - 2012. - Т. 2, № 4. - С. 715-722.
4. Фильчаков Ф.В., Грабовой А.Н., Лён А.Д., Кукушкина С.Н., Коровин С.И., Кукушкина М.Н., Весельская В.Н., Таран Л.Н. Локальный иммунный ответ у больных меланомой кожи: связь с эффективностью интерферонотерапии // Клин. онкол. - 2014. - № 4 (16). – С. 12-16.
5. Франциянц Е.М., Комарова Е.Ф., Бандовкина В.А., Позднякова В.В., Черярина Н.Д. Уровень некоторых опухолевых маркеров в ткани меланомы кожи, ее перифокальной зоны и

по линии резекции // Молекулярная медицина. – 2014. - № 3. – С. 57-60.

6. Curiel T.J., Coukos S., Zou L et al. Specific recruitment of regulatory T-cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival // Nat. Med. - 2004. - V. 10. - P. 942-949.
7. Fazekas St., Groth B., Zhu E., Asad S., Lee L. Flow cytometric detection of human regulatory T-cells. // Methods Mol. Biol. - 2011. - V. 114, № 9. - P. 1209-1217.
8. Mizukami Y., Kono K., Kavaguchi Y. et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of FoxP3+ regulatory T-cells in gastric cancer // Int. J. Cancer. - 2008. - V. 122. - P. 2286-2293.
9. Uzdensky A., Demyanenko S., Bibov M., Sharifulina S., Kit O., Przhedetski Y., Pozdnyakova V. Expression of proteins involved in epigenetic regulation in human cutaneous melanoma and peritumoral skin // Tumor Biology. - Springer, 2014.
10. Wang E., Panelli M.C., Zavaglia K. et al. (2004) Melanoma-restricted genes // J. Transl. Med. - 2: 34–40.

Рецензенты:

Каймакчи О.Ю., д.м.н., ассистент кафедры онкологии с курсом онкологии и детской онкологии ФПК и ППС ГБОУ ВПО «РостГМУ» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Голотина Л.Ю., д.м.н., профессор, ассистент кафедры онкологии с курсом онкологии и детской онкологии ФПК и ППС ГБОУ ВПО «РостГМУ» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.