

ФАКТОРЫ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ РАКЕ ПИЩЕВОДА РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Кит О.И.¹, Максимов А.Ю.¹, Колесников Е.Н.¹, Трифанов В.С.¹, Златник Е.Ю.¹, Новикова И.А.¹, Селютина О.Н.¹, Загора Г.И.¹, Базаев А.Л.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия (344037, Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, 63), e-mail: rnioi@list.ru

Проведено исследование некоторых субпопуляций лимфоцитов, присутствующих в тканях опухоли при раке пищевода, особенности их распределения при хирургическом лечении в опухолевом очаге, по линии резекции пищевода и в перифокальной зоне между линией резекции и видимой границей опухоли. Исследование проведено у больных с опухолями разной степени дифференцировки от G₁ до G₃. В изученных препаратах опухолей пищевода найдено максимальное количество CD3+CD4+ Т-лимфоцитов и Т regs по сравнению с остальными образцами тканей. Выявлены некоторые гендерные различия, а также различия в зависимости от степени дифференцировки: в высокодифференцированных опухолях уровни CD3+ и CD3+CD4+ клеток были выше, чем в низкодифференцированных, но уровень Т regs повышен в образцах всех опухолей вне зависимости от степени дифференцировки.

Ключевые слова: рак пищевода, степень дифференцировки, лимфоциты.

LOCAL IMMUNITY FACTORS IN ESOPHAGEAL CANCER WITH DIFFERENT DEGREES OF DIFFERENTIATION

Kit O.I.¹, Maksimov A.Yu.¹, Kolesnikov E.N.¹, Trifanov V.S.¹, Zlatnik E.Yu.¹, Novikova I.A.¹, Selyutina O.N.¹, Zakora G.I.¹, Bazaev A.L.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia (344037, Rostov-on-Don, 14 Line, 63), e-mail: rnioi@list.ru

Some subpopulations of lymphocytes in esophageal cancer and characteristics of their distribution in tumor tissue, along the resection line and in perifocal zone between the resection line and visual tumor border were studied in patients with various tumor grades (G₁-G₃) receiving surgical treatment. Esophageal tumor tissue showed the highest levels of CD3+CD4+ T-lymphocytes and T-regs in comparison with other tissue samples. Some gender differences were found, as well as differences dependent on the degree of tumor differentiation: levels of CD3+ and CD3+CD4+ cells in well-differentiated tumors were higher than in poorly differentiated ones, while the level of T-regs was increased in all tumor samples irrespectively of their grade.

Keywords: esophageal cancer, degree of differentiation, lymphocytes.

Рак пищевода занимает 8-е место в структуре злокачественных новообразований в мире [8]. В настоящее время в мире ежегодно регистрируется около 480 тысяч новых случаев этого заболевания, при этом смертность: 400 тысяч смертей от рака пищевода каждый год [7].

Прогноз онкологических заболеваний, как и возможность применения иммунотерапии в комплексном лечении, не в последнюю очередь зависит от состояния локального иммунитета [1]. При диагностическом гистологическом исследовании опухолей пищевода в них нередко отмечается лимфоцитарная инфильтрация, однако, ее роль в течении и прогнозе заболевания остается дискуссионной. Происхождение ее также неясно, так как пищевод, в отличие от желудка, толстого кишечника, бронхов, не содержит MALT или BALT. В последнее время в литературе встречаются сообщения об ассоциации рака пищевода с

присутствием некоторых вирусов, прежде всего, ВПЧ, что отчасти может объяснять лимфоцитарную инфильтрацию [6, 9, 10].

Целью данной работы является изучение клеточных факторов локального иммунитета при раке пищевода с различными характеристиками опухолей и организма-опухоленосителя.

Материалы и методы

Объектом изучения были фрагменты ткани опухоли и перитуморальной области 25 пациентов, прооперированных по поводу рака пищевода (6 женщин и 19 мужчин в возрасте от 40 до 77 лет), оперированных в отделении абдоминальной онкологии №1 Ростовского научно-исследовательского онкологического института за период с 2014 по 2015 годы. Все случаи заболевания были первичными, неоадьювантного лечения не проводилось. Преимущественное поражение верхнегрудного отдела пищевода выявлено у 1 больного, среднегрудного – у 12 больных, нижнегрудного – у 11 больных, у одного больного выявлено поражение абдоминального отдела пищевода. Распределение больных по распространенности опухолевого процесса представлено в таблице 1.

Таблица 1

Распределение пациентов по стадиям опухолевого процесса

Стадия	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
Количество больных	2	4	6	2	7	1	3
%	8	16	24	8	28	4	12

После предварительной подготовки всем больным по показаниям было выполнено оперативное вмешательство на органах брюшной полости и грудной клетки. Выбор объема операции определялся локализацией и размерами опухоли; распространенностью – стадией опухолевого процесса; наличием отдаленных метастазов; морфологическими характеристиками новообразования; возрастом и общим состоянием больных.

В зависимости от локализации и формы роста опухоли и объема поражения были выполнены следующие объемы операций: 24 больным с локализацией рака в среднегрудном, нижнегрудном и абдоминальном отделах пищевода выполнено оперативное вмешательство в объеме – субтотальная резекция пищевода, проксимальная резекция желудка с одномоментной внутриплевральной пластикой пищевода желудком. Одному больному с диагнозом рак верхнегрудного отдела пищевода выполнена экстирпация пищевода с формированием эзофаго и гастростомии (операция типа Добромыслова-Торека). Всем больным (25) стандартно выполняли двухзональную лимфадиссекцию.

При гистологическом исследовании был выявлен плоскоклеточный рак у 7 больных без ороговения, у 18 с ороговением. У 8 больных определялась низкодифференцированная степень дифференцировки опухоли, у 12 – умереннодифференцированная, у 5 – высокодифференцированная.

Исследование факторов локального клеточного иммунитета проводили не позднее, чем через час после хирургического лечения на свежем послеоперационном материале. Фрагменты опухолевой ткани, перитуморальной зоны (ПЗ, визуально неизменной ткани, прилежащей к опухоли) и линии резекции (ЛР, ткани, удаленной от опухоли на расстояние 2-4 см дистально и проксимально, гомогенизировали с помощью дезагрегирующего устройства BD Medimachine. В гомогенатах тканей определяли популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов на проточном цитометре FACSCantoII (BD) с панелью антител Т-, В-, NK (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56), включая Т-клетки с TCR- рецептором $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$; рассчитывали уровни NKT (CD3+CD16/56+), DN (CD3+CD4-CD8-); дополнительно оценивали количественное содержание Т-регуляторных (Т-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 [5].

Результаты выражали в процентах от общего количества лимфоцитов, для TCR $\alpha\beta$ TCR $\gamma\delta$ – в процентах от CD3+, а для Т-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

Проводили сравнение полученных показателей: в опухоли, ПЗ и ЛР; в зависимости от пола больных; в зависимости от степени дифференцировки опухоли.

Результаты представлены в таблицы 2, 3 и на рисунке 1.

Таблица 2

Характеристика факторов локального клеточного иммунитета у больных раком пищевода

Субпопуляции лимфоцитов, %	Образцы тканей (n=25)		
	Опухоль	Перитуморальная зона	Линия резекции
CD3+	76,5±2,7	66,5±5,1	60,6±5,7
CD3+CD4+	47,8±6,06* **	29,1±5,76	23,6±4,26
CD3+CD8+	27,3±4,3	26,5±3,1	26,4±4,7
TCR $\alpha\beta$	92,3±2,43	89,4±3,45	88,0±2,22

TCR $\gamma\delta$	7,05 \pm 2,38	9,36 \pm 3,0	10,4 \pm 2,2
CD16+/56+	8,0 \pm 2,9	8,4 \pm 2,8	13,1 \pm 3,0
CD19+	10,1 \pm 1,4	8,0 \pm 2,1	8,7 \pm 2,0
T regs (CD4+ CD25+CD127dim)	19,1 \pm 2,8* **	8,1 \pm 2,0	3,8 \pm 1,1

Примечание. * - статистически достоверные отличия от ткани ЛР; ** - статистически достоверные отличия от ткани ПЗ (p<0,05)

Как видно из таблицы 2, обнаружен ряд статистически достоверных различий по содержанию исследованных субпопуляций лимфоцитов в тканях опухоли и немалигнизированных образцах (ПЗ и ЛР). Так, в опухолевой ткани выше, чем в ткани ЛР, оказалось содержание CD3+CD4+ и T regs, также имеющих рецептор CD4, которые могут рассматриваться по иммунофенотипу как часть общей Т-хелперно-индукторной субпопуляции. Среди Т-лимфоцитов преобладают Т-клетки с фенотипом TCR $\alpha\beta$, как в крови, но не в ткани толстой кишки, где их соотношение обратное. Уровни остальных исследованных субпопуляций не имеют статистически значимых различий между образцами тканей.

Некоторые гендерные различия исследованных характеристик представлены в таблице 3.

Таблица 3

Сравнительная характеристика факторов локального иммунитета у мужчин и женщин, больных раком пищевода

Показатели, %	Образцы тканей					
	Опухоль		ПЗ		ЛР	
	мужчины	женщины	мужчины	женщины	мужчины	женщины
CD3+	77,6 \pm 6,1	84,8 \pm 3,9*	61,8 \pm 7,5	70,3 \pm 14,5	60,2 \pm 7,4	60,2 \pm 12,4

Продолжение таблицы 3

CD3+CD4+	37,0 \pm 3,9* ** **	52,5 \pm 5,5* ***	24,4 \pm 3,6	34,4 \pm 10,2	20,5 \pm 3,4	27,5 \pm 6,7
CD3+CD8+	29,7 \pm 4,1	23,9 \pm 2,4	28,1 \pm 4,6	25,6 \pm 7,8	28,0 \pm 5,7	24,3 \pm 5,6
CD19+	8,4 \pm 3,4	12,2 \pm 3,6	11,5 \pm 4,2	7,9 \pm 3,1	10,7 \pm 3,5	7,8 \pm 3,1
CD16/56+	10,1 \pm 3,7	4,0 \pm 0,9*	10,9 \pm 3,4	5,1 \pm 2,1*	13,2 \pm 3,8	14,1 \pm 6,3
NKT (CD3+CD16/56+)	5,4 \pm 1,1	4,7 \pm 1,9	6,1 \pm 1,9	5,9 \pm 1,9	6,7 \pm 1,4	6,2 \pm 2,7
DN CD3+CD4- CD8-	10,5 \pm 2,1	8,1 \pm 3,4	8,7 \pm 1,4	6,9 \pm 3,1	11,0 \pm 3,6	9,8 \pm 4,9
T regs (CD4+	21,0 \pm 2,7*	18,3 \pm 3,6*	5,1 \pm 0,7	11,2 \pm 6,1	4,3 \pm 0,9	3,2 \pm 1,8

CD25+CD127dim)	**					
----------------	----	--	--	--	--	--

Примечания: * - статистически достоверные отличия от ткани ЛР; ** - статистически достоверные отличия от ткани ПЗ; *** - статистически достоверные различия в зависимости от пола больных

У женщин выявлены различия по уровням CD3+ клеток, которые были выше в опухоли по сравнению с тканью ЛР, и NK-клеток, которые, напротив, были ниже, чем в ЛР. Обнаружено также более высокое содержание CD3+CD4+ лимфоцитов в опухолевой ткани у женщин по сравнению с мужчинами.

Сравнительная характеристика содержания лимфоцитов исследованных субпопуляций в опухолях различной степени дифференцировки представлена на рисунке 1. Несмотря на выраженную индивидуальную вариабельность полученных данных, удалось выявить ряд статистически достоверных различий.

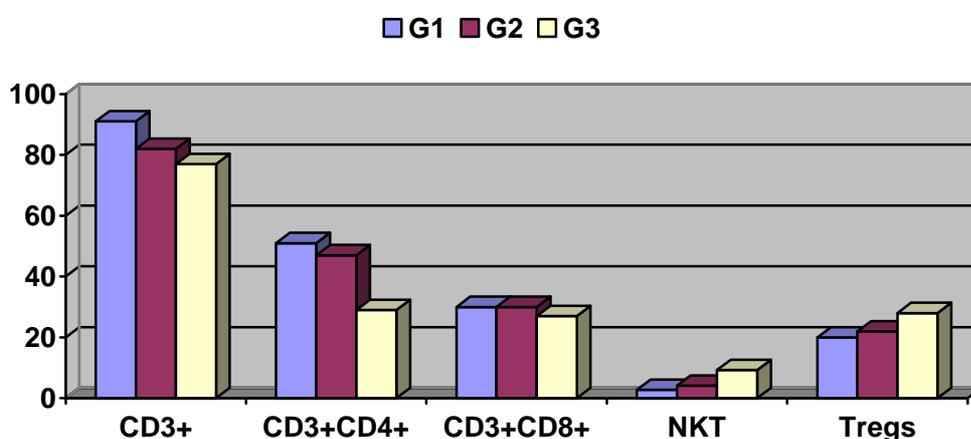


Рисунок 1. Содержание лимфоцитов некоторых субпопуляций в ткани опухолей с различной степенью дифференцировки (%).

Как видно из рисунка 1, в высокодифференцированных опухолях (G1) содержится статистически достоверно больше зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), а также CD3+CD4+ клеток, чем в низкодифференцированных (G3); умеренно-дифференцированные опухоли (G2) занимают промежуточное положение. Описанная разница особенно демонстративна для CD3+CD4+ клеток, составляя $51,0 \pm 2,7\%$ для G1, $46,9 \pm 5,8\%$ для G2 и $25,8 \pm 6,8\%$ для G3; последний показатель статистически значимо ниже двух первых ($p < 0,05$). Следует отметить, что соответствующие данные по проценту T regs в опухолевой ткани не имели столь выраженных различий (рисунок 1), то есть их уровень высок вне зависимости от степени дифференцировки опухоли. Напротив, уровни NKT-лимфоцитов были статистически достоверно выше в низкодифференцированных опухолях G3 ($9,3 \pm 2,1\%$ против $4,1 \pm 1,1\%$ при опухолях G2 и $2,8 \pm 0,7\%$ в высокодифференцированных опухолях G1; $p < 0,05$). Содержание CD3+CD8+ и В-клеток в опухолях с различной степенью дифференцировки не различаются.

Заключение

Итак, удалось обнаружить некоторые различия показателей локального клеточного иммунитета в тканевых образцах больных раком пищевода. Опухоль отличается от прилежащих к ней немалигнизированных тканей более высоким содержанием хелперно-индукторных и Т-регуляторных лимфоцитов. Отмечены некоторые гендерные различия, свидетельствующие о том, что у женщин в локальные иммунные реакции более интенсивно вовлечено адаптивное звено клеточного иммунитета, а у мужчин – врожденное, связанное с НК-клетками. Однако, учитывая малочисленную группу больных женского пола, эти наблюдения можно рассматривать как предварительные. Установленные различия субпопуляционного состава лимфоцитов в опухолях с различной степенью дифференцировки позволяют предположить более выраженное нарушение Т-хелперно-индукторной субпопуляции при, по-видимому, компенсаторном повышении лимфоцитов минорной субпопуляции НКТ в образцах ткани низкодифференцированного рака. В целом, полученные данные соответствуют полученным нами ранее на других локализациях [2, 3, 4], что предполагает общность механизмов взаимодействия опухоли и иммунной системы организма опухоленосителя при различных злокачественных новообразованиях. Возможно, CD3+CD4+ клетки, мигрируют из крови через опухолевые сосуды с повышенной проницаемостью и адгезивными свойствами эндотелия, при этом происходит отбор минорной субпопуляции Т regs, обладающих проонкогенными и иммуносупрессивными свойствами, для заселения опухолевой ткани.

Список литературы

1. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. – Киев. «Наукова Думка», –2005. –792 с.
2. Златник Е.Ю., Бахтин А.В., Кочуев С.С., Новикова И.А., Селютина О.Н., Непомнящая Е.М., Пржедецкий Ю.В., Позднякова В.В., Захарова Н.А. Факторы локального клеточного иммунитета при меланоме кожи // Современные проблемы науки и образования. – 2015. - № 5. URL: <http://www.science-education.ru/128-21801>.
3. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Ильченко С.А., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Непомнящая Е.М. Факторы локального иммунитета у больных раком желудка при применении химиотерапии с озонированными средами // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/111-9893>.

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. – № 4 (76). – С. 11-16.
5. 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.
6. El-Serag HB, Hollier JM, Gravitt P, Alsarraj A, Younes M. Human papillomavirus and the risk of Barrett's esophagus [published online ahead of print August 14, 2012]. *Dis Esophagus*. doi: 10.1111/j. 1442-2050.2012.01392.x.
7. Ferlay J, Shin HR, Bray F. et al. Estimates of world wide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 // *J. Cancer*. – 2010. – Vol.127. – P.28932917.
8. Jemal A.,Bray F.,Center M.M.et al. Global cancer statistics // *CA Cancer J. Clin*. 2011. Vol. 61 (2). P. 69–90
9. Xu W. · Liu Z. · Bao Q. · Qian Z. Viruses, Other Pathogenic Microorganisms and Esophageal Cancer // *Gastrointest Tumors*. – 2015. - Vol. 2, No. 1, P. 2-13 (DOI:10.1159/000380897)
10. Zandberg D. P., Bhargava R., Badin S., Cullen K. J. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2013, vol. 63, no.1, p. 57–81. (DOI: 10.3322/caac.21167).

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.