

## ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРОВ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ САРКОМАМИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Златник Е.Ю., Непомнящая Е.М., Новикова И.А., Алиев Т.А., Закора Г.И., Селютина О.Н., Ващенко Л.Н., Андрейко Е.А., Аушева Т.В., Бондаренко Е.С.

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: rnoi-patology@yandex.ru*

Изучали субпопуляционный состав лимфоцитов при первичных и рецидивных саркомах мягких тканей в гомогенатах ткани опухоли, перитуморальной области и линии резекции методом проточной цитофлюориметрии. При III стадии заболевания установлены различия, связанные с высоким содержанием Tregs и низким - CD3+CD8+ в ткани рецидивных опухолей по сравнению с первичными. Обнаружены высокие уровни Tregs и DN T-лимфоцитов и более низкие CD3+CD4+, CD3+CD8+ и NK в ткани линии резекции рецидивных сарком. Ткань недифференцированной опухоли (G4) характеризуется снижением содержания NK-лимфоцитов по сравнению с G3, а наиболее высокие уровни DN T-лимфоцитов отмечены в рецидивных недифференцированных саркомах. Различия состояния локального иммунитета объясняют развитие рецидивов сарком мягких тканей.

Ключевые слова: опухоли мягких тканей, рецидивы, локальный иммунитет.

## CHARACTERISTICS OF LOCAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH SOFT TISSUE SARCOMAS

Zlatnik E.Yu., Nepomnyashchaya E.M., Novikova I. A., Aliev T. A., Zakora G.I., Selyutina O.N., Vashchenko L. N., Andreyko E.A., Ausheva T. V., Bondarenko E.S.

*Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, e-mail: rnoi-patology@yandex.ru*

Lymphocyte subpopulation were studied by the flow cytofluorometry composition in tumor tissue homogenates, peritumoral area and resection line of patients with primary and recurrent soft tissue sarcomas. Patients with stage III disease showed differences including high Tregs and low CD3+CD8+ levels in recurrent tumors tissue in comparison with primary tumors. High levels of Tregs and DN T-lymphocytes and lower CD3+CD4+, CD3+CD8+ and NK were found in the resection line tissue of recurrent sarcoma. Tissue undifferentiated tumors (G4) was characterized by a reduced level of NK-lymphocytes compared to the G3 tumors and the highest levels of DN T-lymphocytes levels were registered in recurrent undifferentiated sarcoma. Differences in the local statuses can contribute to recurrences of soft tissue sarcomas.

Keywords: soft tissue tumor, recurrence, local immunity.

Саркомы мягких тканей (СМТ) – сравнительно редкая группа злокачественных новообразований различной локализации и гистологической структуры [9]. Широкий гистологический спектр СМТ объясняется тем, что они происходят из эмбриональных мезенхимальных клеток, которые делятся на клетки поперечно-полосатой мускулатуры, жировую или соединительную ткань, кости и хрящи. Также к СМТ относятся опухоли периферических нервов [8]. По статистическим данным, в 2013 году в России зарегистрировано 3407 случаев СМТ: среди мужчин 1550 случаев, среди женщин – 1857. Абсолютное число умерших составило: у мужчин – 1465 случаев, у женщин - 1451, а их средний возраст - 58,9 у мужчин, 64,8 у женщин [2].

СМТ – агрессивные опухоли с высокой степенью рецидивирования. Радикальная резекция в пределах здоровых тканей позволяет снизить процент рецидивов до 25-30% без

последующей терапии. После ампутаций и экзартикуляций рецидивы возникают в 10-15% случаев [1]. Раннее появление локального рецидива повышает риск метастазирования, преимущественно гематогенных [1]. В 70-80% случаев метастазы локализуются в легких, печени. Средняя выживаемость после развития отдаленных метастазов составляет 11-15 месяцев [2]. В настоящее время выделяют более 30 гистологических подтипов СМТ [7; 8]. Вследствие такого разнообразия в литературе не всегда удается определить сопоставимые группы больных.

Высокая частота рецидивирования СМТ побуждает к поиску ее причин. Возникает интерес к микроокружению опухолей, в частности иммунологическому. От того, насколько эффективна элиминация резидуальных опухолевых клеток после операции, зависит опасность развития локального рецидива. Возможность такой элиминации связана прежде всего с иммунокомпетентными клетками, присутствующими в опухоли и в прилегающей к ней области, их состав и характеристики функциональной активности представляют значительный интерес. Информации об особенностях локального иммунитета при СМТ в доступной нам литературе не обнаружено. Имеются немногочисленные публикации о местном иммунитете при опухолях других локализаций [3].

**Цель работы:** дать сравнительную оценку факторов локального иммунитета при первичных и рецидивных саркомах мягких тканей.

#### **Материалы и методы**

Под наблюдением находилось 22 больных с первичными и 16 с рецидивами сарком мягких тканей. Сроки развития рецидивов составляли от 2 месяцев до 7 лет, у ряда больных они были многократными. Средний возраст впервые зарегистрированных больных с СМТ составил 56 лет, с рецидивами СМТ – 55 лет. Среди первичных больных с СМТ было 12 женщин и 10 мужчин; при рецидивах СМТ – 8 мужчин и 8 женщин, т.е. распределение первичных и рецидивных больных по полу и возрасту было однотипным. СМТ локализовались во всех частях тела человека, но наиболее часто располагаются на конечностях и туловище. У больных с первичными СМТ опухоли распределялись следующим образом: у одного пациента на туловище, у 6 – на верхних конечностях, у 15 – на нижних конечностях.

Гистологическое строение первичных СМТ было следующим: по 5 случаев липосаркомы и плеоморфной саркомы, 4 случая лейомиосаркомы, 2 – ангиолейомиосаркомы, по 1 – синовиальной саркомы, рабдомиосаркомы, злокачественной шванномы, недифференцированной саркомы, злокачественной мезенхимомы и миксосаркомы. В группе с рецидивами СМТ диагностировано по 3 случая плеоморфной саркомы и липосаркомы, по 2 – лейомиосаркомы и фибросаркомы, по 1 - синовиальной

саркомы, рабдомиосаркомы, злокачественной шванномы, злокачественной гиберномы, недифференцированной саркомы и миксосаркомы.

Распределение по стадиям больных с первичными саркомами мягких тканей было следующим: у 4 пациентов определялась Па стадия, у 2 пациентов – Пс, у 14 – Ш, у 2 – IV стадия. Среди больных с рецидивами у одного пациента была Пв стадия, у 2 – Па, у 11 – Ш, у 2 – IV стадия.

У 20 больных из 22 с первичными СМТ опухоли располагались глубоко в мягких тканях и имели диаметр больше 5 см. В 2 случаях опухоль была размерами более 5 см в диаметре и располагалась поверхностно, имела экзофитный рост.

У 15 больных из 16 с рецидивами СМТ опухоли имели размер более 5 см и локализовались в глубоко лежащих тканях. У одного пациента опухоль была менее 5 см и располагалась поверхностно, без признаков прорастания кожи.

По степени дифференцировки опухоли распределялись следующим образом: у 2 больных с первичными опухолями выявлена высокодифференцированная опухоль (G1), у 3 – умереннодифференцированная опухоль (G2), у 15 – низкодифференцированная опухоль (G3), у 2 – недифференцированная опухоль (G4). В группе с рецидивами СМТ высокодифференцированная опухоль (G1) определялась у 2 больных, умереннодифференцированная опухоль (G2) – у 2, низкодифференцированная опухоль (G3) – у 9 больных, недифференцированная опухоль (G4) – в 3 случаях. У одного больного с первичной СМТ наблюдался метастаз в кости таза, а у 2 больных с рецидивами одновременно выявлены метастазы в легкие.

Больным выполняли объем операции от удаления опухоли мягких тканей с реконструктивно-пластическим компонентом до ампутаций конечностей.

Удаленные опухоли подвергали морфологическому исследованию; кроме того, фрагменты опухолевой ткани, перитуморальной зоны (визуально неизменной ткани, прилежащей к опухоли) и ткани, взятой по линии резекции, 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); дополнительно изучали 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; 6].

Результаты выражали в процентах от общего количества лимфоцитов, 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 исследования и их обсуждение

В таблице приведено процентное содержание лимфоцитов, исследованных субпопуляций, в образцах тканей больных первичными и рецидивными СМТ. Представлены данные по опухолям наиболее часто встречающейся III стадии.

#### Сравнительная характеристика показателей клеточного локального иммунитета у больных саркомами мягких тканей III стадии

| Показатели, %             | СМТ              |               |             |                  |            |             |
|---------------------------|------------------|---------------|-------------|------------------|------------|-------------|
|                           | Первичные (n=10) |               |             | Рецидивные (n=7) |            |             |
|                           | Опух             | ПЗ            | ЛР          | Опух             | ПЗ         | ЛР          |
| CD3+                      | 83,8±2,7* **     | 73,0±2,4      | 70,5±2,1*** | 78,7±2,2*        | 68,3±1,8** | 81,0±3,0*** |
| CD3+CD4+                  | 31,3±1,8         | 31,3±1,4      | 33,6±1,7*** | 31,6±1,3*        | 27,8±1,2   | 28,1±1,8*** |
| CD3+CD8+                  | 42,8±2,1* **     | 31,3±1,7      | 28,7±1,7*** | 36,2±1,8*        | 28,2±1,8** | 35,4±1,7*** |
| CD19+                     | 1,5±0,3* **      | 2,8±0,25** ** | 6,2±0,7***  | 1,7±0,03* **     | 3,8±0,3*** | 0,6±0,04*** |
| CD16/56+                  | 12,4±1,2* **     | 21,3±1,3      | 21,6±1,6*** | 16,4±1,9*        | 23,4±1,7** | 15,3±3,3*** |
| CD3+CD4-CD8-              | 8,9±1,3          | 7,8±1,5**     | 7,9±1,4***  | 10,1±1,4         | 12,2±1,5** | 13,2±0,8*** |
| CD3+CD16/56+              | 5,5±0,3**        | 8,9±0,8**     | 9,9±1,1     | 6,8±1,0* **      | 12,0±1,2** | 11,1±1,5    |
| CD3+CD4+CD25+<br>CD127dim | 7,5±0,9* **      | 3,3±0,4       | 1,7±0,03*** | 12,8±1,7* **     | 4,3±0,8    | 8,3±1,2***  |

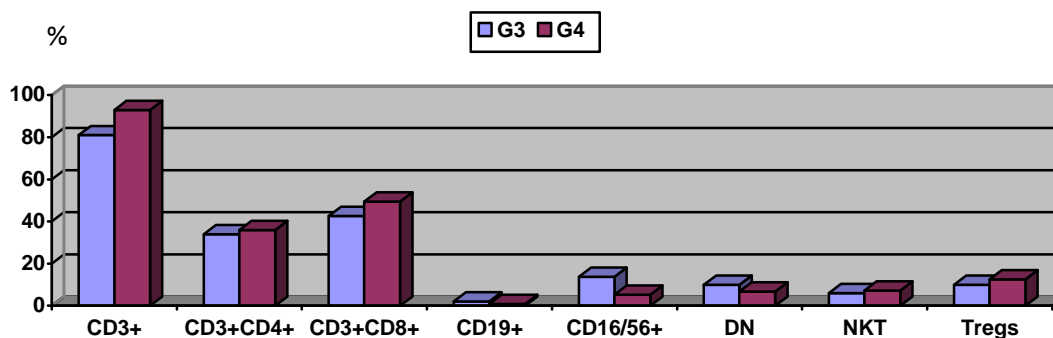
Примечание. \* – статистически достоверные различия между показателями опухолевой ткани; \*\* – статистически достоверные различия между показателями ткани перитуморальных зон (ПЗ); \*\*\* – статистически достоверные различия между показателями ткани линии резекции (ЛР); • – статистически достоверные отличия от показателей перитуморальной зоны \*\* – статистически достоверные отличия от показателей линии резекции (p<0,05).

Сопоставление лимфоцитарного состава образцов тканей между первичными и рецидивными СМТ установило, что процентное содержание CD3+CD8+ лимфоцитов в ткани первичных опухолей статистически достоверно выше, чем в ткани рецидивных, а количество Tregs, напротив, в них ниже. Различия обнаружены также при сопоставлении показателей перитуморальной зоны первичных и рецидивных опухолей. Так, в ткани перитуморальной зоны первичных сарком ниже, чем при рецидивных, оказалось содержание CD19+ лимфоцитов, а также минорных Т-клеточных субпопуляций NKT и DN. Кроме того, статистически достоверные различия исследуемых показателей найдены и в ткани линии резекции: уровни CD3+, CD3+CD8+, DN и Tregs в рецидивных опухолях были выше, а количество CD3+CD4+ и CD19+ клеток было ниже, чем в первичных.

Из таблицы также видно, что состав лимфоцитов в опухоли отличался от такового в образцах тканей, не пораженных опухолью. Так, в первичных опухолях уровни CD3+, CD3+CD8+ и Tregs были статистически значимо выше, а уровни CD19+, NK- и NKT клеток – ниже, чем в перитуморальной области и в ткани линии резекции. Кроме того, в ткани линии резекции количество Tregs было ниже, а В-лимфоцитов (CD19+) – выше, чем в образцах перитуморальной зоны. Аналогичные различия наблюдались в ткани рецидивных СМТ с дополнительно выявленным превышением содержания CD3+CD4+ клеток в опухоли по сравнению с перитуморальной зоной.

Проведенное исследование локального иммунологического статуса первичных и рецидивных опухолей СМТ III стадии показало достоверное различие из восьми исследованных параметров: в ткани опухоли – по двум, в ткани перитуморальной зоны – по трем, в ткани линии резекции – по семи показателям. Ткань линии резекции отличалась от ткани первичной опухоли по шести иммунологическим показателям, а от рецидивной – по трем. Таким образом, линия резекции рецидивной опухоли была иммунологически близка к ткани опухоли.

Особое значение для прогноза имеет степень дифференцировки опухоли, в связи с этим был проведен сравнительный анализ изученных иммунологических показателей при G3 и G4. Результаты представлены на рисунках А и Б.



*Рис. А. Уровни различных лимфоцитов в ткани первичных СМТ различной степени дифференцировки*

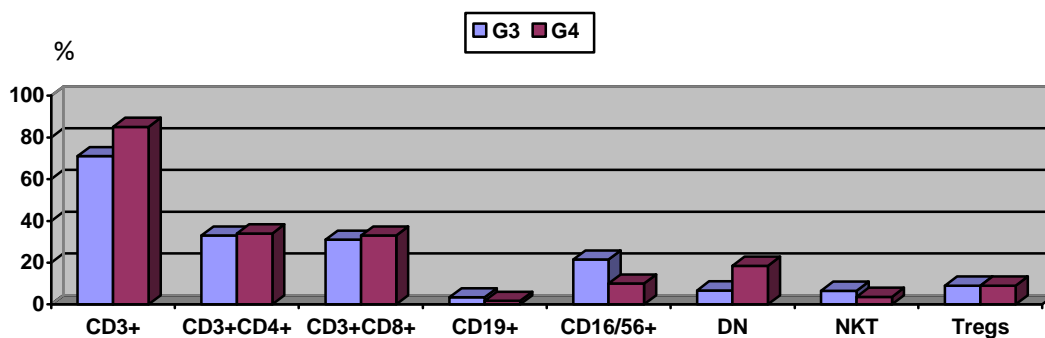


Рис. Б. Уровни различных лимфоцитов в ткани рецидивных (Б) СМТ различной степени дифференцировки

Как видно из рисунков А и Б, уровни НК-клеток как в первичных, так и в рецидивных СМТ снижаются по мере уменьшения степени дифференцировки опухолей. В ткани первичных и рецидивных СМТ при G4 обнаружено больше Т-лимфоцитов (CD3+), чем в G3 опухолях. Однако в первичных СМТ это достигается за счет более значительного присутствия CD3+CD8+ клеток (49,5±1,5 и 42,7±2,1% соответственно), а в рецидивных – за счет высокого содержания в ткани G4 опухолей DN Т-клеток (CD3+CD4-CD8-), составляющего 18,5±1,7 при G4 и 6,7±1,2% при G3; для всех показателей  $p < 0,05$ . Кроме того, в рецидивных G4 СМТ в опухоли снижается по сравнению с G3 процент NKT-клеток, составляя 3,6±0,6 против 6,5±1,1% ( $p < 0,05$ ).

### Заключение

Проведенное исследование выявило ряд различий показателей локального клеточного иммунитета при саркомах мягких тканей между образцами опухоли, перитуморальной зоны и линии резекции, а также между первичными и рецидивными опухолями. Некоторые из найденных различий были связаны со степенью дифференцировки опухоли.

Более низкое содержание в ткани рецидивных по сравнению с первичными СМТ CD3+CD8+ Т-лимфоцитов и более высокое – Tregs характеризует иммуносупрессию. Последняя связана с угнетением цитотоксического звена адаптивного иммунитета при рецидивах. В рецидивных опухолях СМТ показатели локального иммунитета по сравнению с первичными в тканях по линии резекции незначительно отличаются от таковых в самой опухоли. Данное положение обусловлено преимущественным подавлением цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+ и CD16/56+).

Обнаружение в ткани недифференцированных СМТ, особенно рецидивных, высоких уровней DN Т-лимфоцитов, не экспрессирующих рецепторов основных субпопуляций, по-видимому, отражает нарушения процессов дифференцировки Т-клеток, находящихся в микроокружении этих опухолей. Эти лимфоциты считаются принадлежащими к субпопуляции Т-клеток с TCR $\gamma\delta$ , которые могут обладать свойствами Tregs [10]. В норме

они содержатся в тимусе и в желудочно-кишечном тракте [6]. Однако описано повышение их уровня в крови при некоторых злокачественных опухолях [4], что предполагает негативные изменения иммунного статуса.

Ткань линии резекции рецидивных сарком является иммунологически неполноценной по сравнению с первичными опухолями. Это положение обусловлено увеличенным содержанием количества Т-лимфоцитов, принадлежащих к Tregs и DN, и уменьшенным NK и CD3+CD8+, которые являются предшественниками цитотоксических Т-лимфоцитов. Вероятно, с описанными особенностями связано и многократное рецидивирование, наблюдаемое в данной группе больных.

### Список литературы

1. Алиев М.Д. Введение в онкоортопедию. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2009. - № 1. – С. 14-17.
2. Каприна А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. - М., 2015. - 250 с.
3. Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Никипелова Е.А., Новикова И.А. Местный клеточный иммунитет при аденокарциноме и полипах толстой кишки // Сиб. мед. обозрение. – 2012. - № 4 (76). – С. 11-16.
4. Самотья Е. Двойное негативное (ДА) и двойное позитивное (ДП) Т-лимфоциты при раке и неопухолевых заболеваниях // Онкологический журнал. – 2011. - Т. 5, № 3 (19). – С. 145.
5. Селютин А.В., Сельков С.А. Методы определения Т-регуляторных клеток в периферической крови // Terra medica (Лаб. диагностика). – 2008. - № 4. – С. 19-21.
6. 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.
7. Fisher C. The comparative roles of electron microscopy and immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumors // Histopathology. – 2006. - V. 48. - P. 32-41.
8. Fletcher C.D.M., Unni K.K., Mertens F. Eds. WHO Classification of tumors of soft tissue and bone. – 4-th edition by Fletcher C.D. Metal. – Lyon, 2013.
9. Goldberg Brynn R. et al. Soft Tissue Sarcoma: An Overview // Orthop. Nurs. – 2009 (Jan-Feb). - V. 26 (1). – P. 4-11, quiz 12-3.
10. Jemal A. et al. Cancer statistics / Jemal A., Siegel R., Ward E. J. // Clin. – 2009. - V. 59. – P. 225.