

ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПИЩЕВОДА ПРИ ЕГО РАЗЛИЧНОЙ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ

Кит О.И.¹, Златник Е.Ю.¹, Базаев А.Л.¹, Новикова И.А.¹, Бондаренко Е.С.¹,
Золотарева Е.И.¹, Колесников Е.Н.¹, Трифанов В.С.¹, Санамянц С.В.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: rnoi@list.ru

Целью данной работы явилось изучение показателей иммунологического микроокружения плоскоклеточного рака пищевода у больных с различной распространенностью процесса и расположением в средне-грудном или нижнем отделе. В ткани опухоли, перитуморальной зоне и линии резекции 40 первично выявленных больных плоскоклеточным раком пищевода I-III стадий определяли лимфоцитарные и цитокиновые показатели методами проточной цитометрии и иммуноферментного анализа. Результаты свидетельствуют о прогрессировании нарушений в соотношении лимфоцитарного и цитокинового компонентов при прогрессировании рака пищевода от I до III стадии. В опухолях III стадии отмечено более низкое содержание CD3+, CD4+, CD19+ NK-клеток по сравнению с I и II, а возрастание уровня T-regs лимфоцитов по сравнению с тканью линии резекции не только в опухоли, но и в перитуморальной зоне выявлено на всех стадиях. С увеличением распространенности рака пищевода отмечено прогрессирование различий в составе провоспалительных цитокинов: при III стадии в опухоли, кроме повышения уровней IL-1 β и IL-8, наблюдалась аналогичная динамика в отношении IL-6, а в ткани линии резекции уровни TNF- α и IL-10 были выше, чем при I стадии. Лимфоцитарное и цитокиновое микроокружение опухолей средне-грудного отдела оказалось более неблагоприятным по сравнению с опухолями нижнего отдела пищевода. На основании полученных данных мы считаем возможным использование определения процентного содержания субпопуляций лимфоцитов, а также количества IL-1 β , IL-8, IL-6 в ткани опухоли и IL-10, TNF- α в ткани линии резекции в качестве дополнительных прогностических критериев, ассоциированных с распространенностью, а, следовательно, и прогнозом заболевания, при плоскоклеточной карциноме пищевода.

Ключевые слова: рак пищевода, стадии, локализация, иммунологическое микроокружение, лимфоциты, цитокины.

IMMUNOLOGIC MICROENVIRONMENT OF ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CANCER IN PATIENTS WITH DIFFERENT STAGES AND LOCATION OF THE TUMOR

Kit O.I.¹, Zlatnik E.Y.¹, Bazaev A.L.¹, Novikova I.A.¹, Bondarenko E.S.¹,
Zolotareva E.I.¹, Kolesnikov E.N.¹, Trifanov V.S.¹, Sanamyants S.V.¹

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

Our aim was to study some indices of immunologic microenvironment in patients with esophageal squamous cell cancer with different stages of the disease and tumors' location in the middle or the lower part of the organ. Lymphocytes' and cytokines' amounts were estimated in surgically removed tissue samples of tumor, peritumoral area and resection line of 40 patients with primary diagnosed disease (I-III stages) by flow cytometry and ELISA tests. The results show the enhancement of lymphocytes' and cytokine disbalance along with the progression of tumors' stage from I to III. In tumor tissue of the III stage we found the decrease of CD3+, CD4+, CD19+ NK cells amount in comparison with tumors of I and II stages though the rise of T regs percentage was noted not only in tumor tissue but also in peritumoral area of tumors of any stage. With the growth of the advancement of the esophageal cancer the increase of cytokines' disbalance was observed: in tissue samples of the III stage not only increase of IL-1 β and IL-8 levels, but also of IL-6 was seen while in the resection line tissue TNF- α and IL-10 levels were found to be higher than in I stage. Lymphocyte and cytokine microenvironment of the tumors located in the middle part of the esophagus appeared to be less favorable than of those located in the lower part. Based on our data we consider the testing of lymphocytes' subsets and of IL-1 β , IL-8, IL-6 in tumor tissue and of IL-10, TNF- α in tissue of the resection line to be of some use as supplementary prognostic criteria associated with the stage of tumor in patients with esophageal squamous cell cancer.

Keywords: esophageal cancer, stages, location, immunologic microenvironment, lymphocytes, cytokines.

Параметры локального иммунитета – один из важнейших факторов, определяющих клинические варианты течения злокачественных опухолей, а также исход онкологических заболеваний. В ряде случаев изучение этих показателей может определить потенциальную целесообразность включения методов иммунотерапии в стратегию комплексного лечения онкопатологии [1]. В настоящее время значимость лимфоцитарной инфильтрации опухоли для течения и прогноза окончательно не определена и продолжает оставаться проблемой для дискуссии. Отмечено, что частое присутствие иммунокомпетентных клеток и растворимых молекул определенного спектра в микроокружении опухоли при раке пищевода может быть обусловлено и влиянием вирусного инфицирования, прежде всего вирусом папилломы человека [2], а также воспалительной реакцией в самой опухоли, в том числе вследствие её распада и хронической травматизации. Роль инфильтрации клетками иммунной системы микроокружения опухоли при клинически манифестированных онкологических заболеваниях может быть двойкой в свете представлений об иммуноредактировании опухоли, в соответствии с которой лимфоциты, находящиеся в ней на этом этапе, проявляют иммуносупрессивное и ростостимулирующее действие [3].

В научной литературе данные о прогностическом значении локализации опухоли в пищеводе противоречивы: по мнению одних авторов, локализация эзофагеальной карциномы не играет роли [4], другие отмечают ее влияние на прогноз, причем рассматривают более каудальное расположение рака в качестве независимого фактора более благоприятного прогноза по показателям 1-, 3- и 5-летней общей и бессобытийной продолжительности жизни больных после операции [5; 6].

Данные литературы, отражающие особенности иммунологического микроокружения опухоли при раке пищевода, немногочисленны и не содержат полной информации. В результате иммуногистохимического исследования состава внутриопухолевых лимфоцитов U. Zingg et al. (2010) показали, что количество клеток, экспрессирующих CD3+, CD8+ и FoxP3+ в центральных отделах опухоли ниже, нежели на периферии, при этом достоверных различий по их содержанию при различном клиническом течении заболевания выявлено не было. В отношении CD25+ таких данных не получено.

На этом фоне показано достоверное отличие в концентрации IL-6 в крови больных раком пищевода. Повышенные концентрации этого цитокина отмечались чаще, а их корреляция с ранними стадиями заболевания была выше, чем в случае антигена плоскоклеточного рака (SCCA) и раково-эмбрионального антигена, что позволяет ряду авторов рассматривать IL-6 в качестве онкомаркера (CEA) [7; 8]. Не вызывает сомнения, что и различные другие растворимые продукты иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих опухоль, также могут играть существенную роль в ее прогрессии.

Например, хемокины, к которым относится IL-8, привлекают в область опухоли лимфоциты и макрофаги, среди которых в организме онкологических больных могут преобладать T-reg и M-2, которые являются клетками, продуцирующими ряд цитокинов, такие как VEGF, EGF, TGF-β, IL-6, IL-8, IL-10. Приведенные биологически активные компоненты могут вырабатываться и клетками опухоли, при этом одним из факторов, способствующим активизации этих процессов, может быть гипоксия, сопровождающая прогрессирование карциномы. Выявление взаимоотношений между показателями локального иммунитета и клинико-биологическими характеристиками опухолей и закономерностей их развития может быть перспективным как в научном, так и в прогностическом плане.

Целью исследования явилось изучение показателей иммунологического микроокружения плоскоклеточного рака пищевода с различной распространенностью и локализацией опухоли.

Материалы и методы исследования

В работу включены данные клинико-лабораторного исследования 40 пациентов, находившихся на лечении по поводу рака пищевода в Ростовском научно-исследовательском онкологическом институте, которым проводилось хирургическое лечение. Всем больным была выполнена операция субтотальной резекции пищевода с проксимальной резекцией желудка и одномоментной внутриплевральной пластикой пищевода сформированным желудочным стеблем, дополненная стандартной двухзональной лимфодиссекцией. Другая системная и локальная противоопухолевая терапия не проводилась.

Колебания возраста больных были в интервале от 33 до 76 лет, медиана составила 57,8 года. При гистологическом исследовании у всех больных был определен плоскоклеточный рак пищевода различной степени дифференцировки.

Распределение больных по стадиям заболевания проводили в соответствии с Международной классификацией злокачественных опухолей по системе TNM (AJCC/ UICC 7th ed., 2010). Чаще всего выявлялись II и III стадии заболевания – по 15 (37,5%) наблюдений, в то время как с I стадией - 10 из 40 больных (25%).

У 23 человек (57,5%) локализация опухоли определялась преимущественно в средне-грудном отделе пищевода, в то время как у 17 (42,5%) больных отмечалось ниже-грудное расположение опухоли.

При проведении операции вышеуказанного объема проводили забор образцов тканей размером 0,5x1,0 см из опухоли, перитуморальной зоны (ПЗ, 5–8 см от свободного края опухоли), линии резекции (ЛР, проксимальный конец пищевода в удаленном препарате). Образцы тканей гомогенизировали с помощью Medimachine 30–60 сек., с последующим

центрифугированием 4 мин. при 1500 об/мин. Исследование популяций и субпопуляций лимфоцитов в клеточном осадке проводили на проточном цитометре FACSCantoII (BD) с использованием соответствующих панелей антител: T(CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+), B(CD19+), NK (CD16+CD56+), T-регуляторные (T-reg - CD4+CD25+CD127dim). Количество T, B, NK-клеток выражали в процентах от общего числа лимфоцитов, T-regs – в процентах от CD3+CD4+ клеток. В исследуемых тканях определяли концентрацию цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) методом иммуноферментного анализа («Вектор-Бест», Новосибирск) в соответствии с указаниями производителя. Концентрацию цитокинов выражали в виде удельного содержания в пересчете на 1 г белка гомогената, оцениваемого биуретовым методом (пг/мл/г белка).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием параметрических и непараметрических методов (t-критерий Стьюдента, критерий Уилкоксона, метод непрямых разностей).

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение данных, характеризующих показатели лимфоцитарного состава исследуемых тканей при раке пищевода в зависимости от стадии заболевания, позволило выявить, что увеличение распространённости опухолевого процесса приводит к ряду изменений показателей, характеризующих лимфоцитарное микроокружение опухоли (рисунок 1 А, Б). Так, уровни NK и CD19+ начинают снижаться уже со II стадии по сравнению с I стадией. В свою очередь при III стадии в ткани опухоли содержится меньше CD3+CD4+ и NK-клеток, чем при I стадии. В ПЗ в зависимости от стадии заболевания также отмечено различие по уровню B (CD19+) лимфоцитов, которых при III стадии в 3,4 раза больше, чем при I стадии, а также CD3+, содержание которых при III стадии ниже, чем при II. В образцах ЛР различий в зависимости от стадии рака пищевода не наблюдалось.

Выявлены различия, которые были статистически достоверными, между субпопуляциями лимфоцитов в опухоли, ПЗ и ЛР, начиная с I стадии заболевания. Так, при I стадии в опухоли было больше по сравнению с ЛР CD3+ и CD3+CD4+ лимфоцитов, что особенно проявлялось в отношении T-regs, количество которых в опухолевой ткани в 6 раз превышало аналогичные показатели в ЛР и в 3,78 раза в ПЗ. Для II стадии рака пищевода повышение содержания CD3+ лимфоцитов в опухолевой ткани отмечено в 1,2 раза и T-regs в 3,7 раза по отношению к исследованным тканям ЛР, при этом выявлено снижение уровня CD19+ клеток в 4,2 раза. При II и III стадиях также определено и снижение содержания NK-клеток в ткани опухоли по сравнению с образцами ЛР. Таким образом, отмечено, что при III стадии заболевания уровни лимфоцитов субпопуляций CD3+, CD3+CD4+, T-regs превышали аналогичные показатели не только для ЛР, но и для ПЗ, и при этом в них отмечено более

низкое содержание CD19+ и естественных киллеров, которое было статистически значимым (рис. 1).

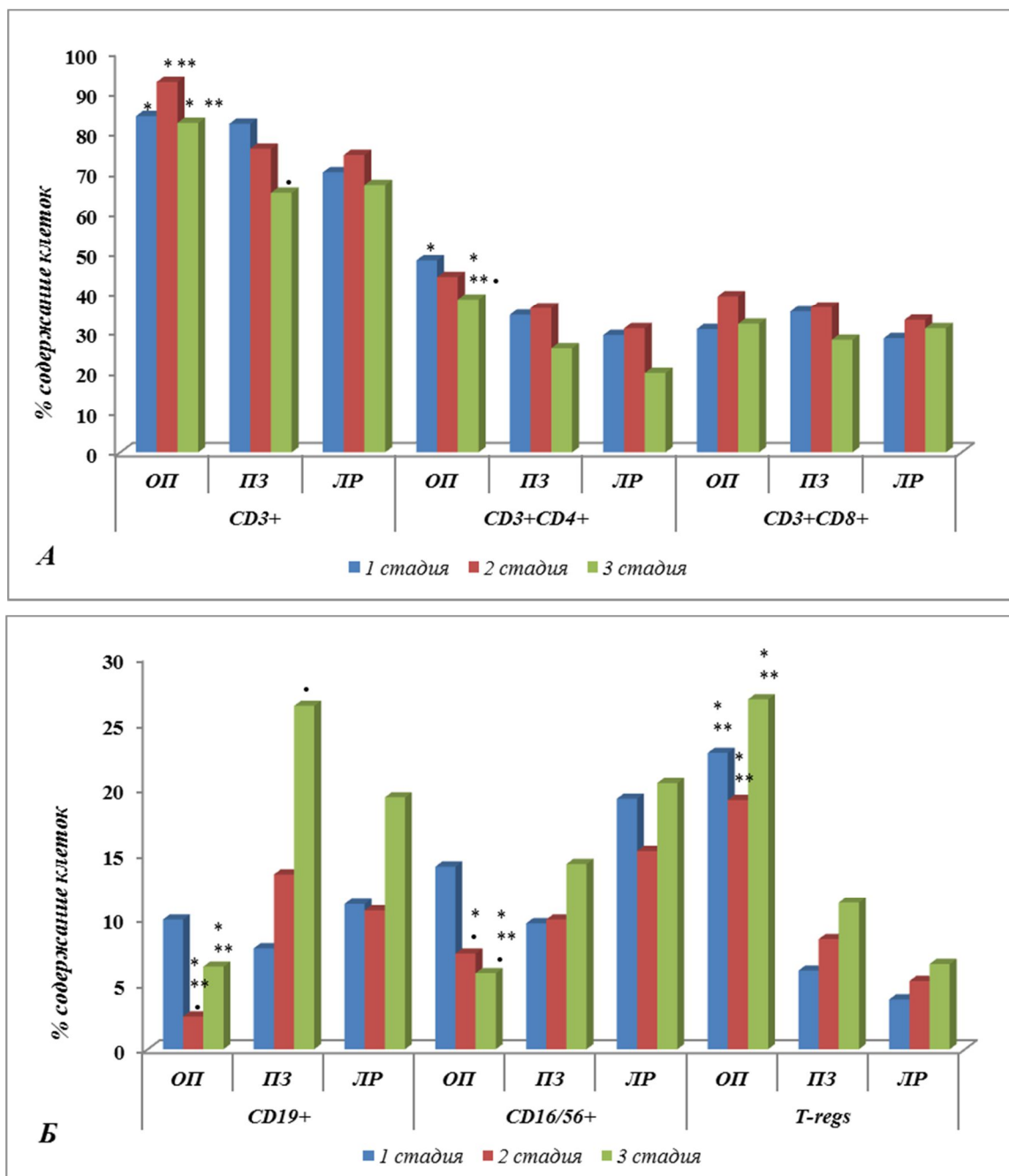


Рис. 1. Факторы локального клеточного иммунитета при раке пищевода различных стадий, %

* – статистически достоверные отличия от показателя ЛР; ** – статистически достоверные отличия от показателя ПЗ; • – статистически достоверные отличия от показателей St I ($p < 0,05$)

Изменение соотношения инфильтрирующих опухоль и другие ткани иммунокомпетентных клеток может находить закономерное отражение в спектре цитокинов

и других биологически активных соединений, определяющих функциональное состояние гетерогенной клеточной популяции в ткани. Результаты определения концентрации ряда выбранных цитокинов в тканях (рисунок 2 А, Б) указывают на то, что различия показателей между тканью опухоли и неопухолевыми тканевыми образцами закономерно возрастают при увеличении распространенности опухоли. В образцах тканей опухолей более ранних стадий рака пищевода отмечено более высокое количество провоспалительных цитокинов (IL-1β в I стадии, IL-1β и IL-8 – во II), тогда как при III стадии наблюдалось повышение уровней не только IL-1β и IL-8, но и IL-6, и эти изменения были статистически достоверными.

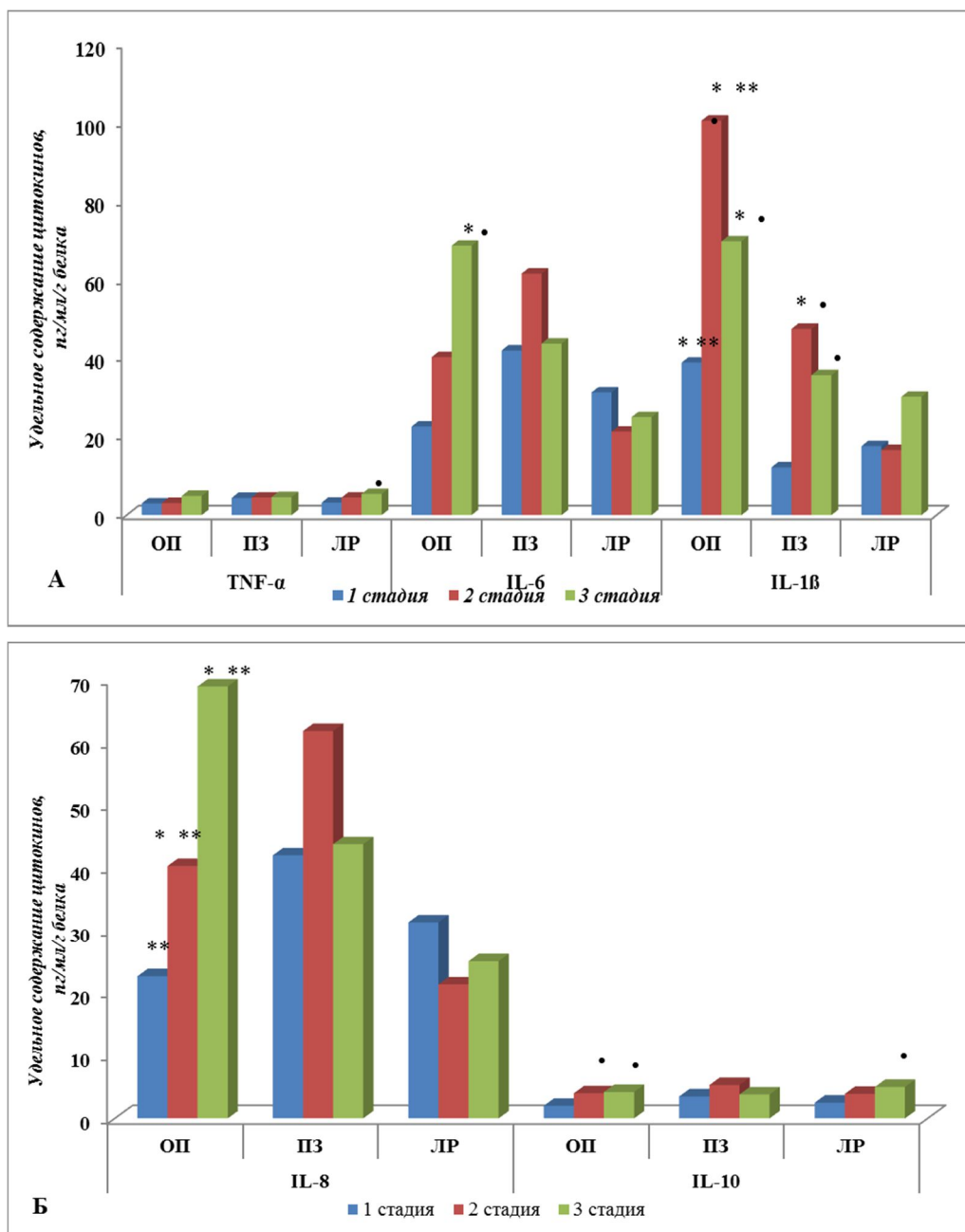


Рис. 2. Концентрация цитокинов при раке пищевода различных стадий, нг/мл/г белка

** – статистически достоверные различия от показателя ЛР; ** – статистически достоверные различия от показателя ПЗ; ● – статистически достоверные отличия от показателей St I ($p < 0,05$)*

Большинство описываемых различий показано не только при сравнении показателей опухоли с ЛР, но и с ПЗ. По мере нарастания распространенности опухоли отмечено возрастание локальных уровней ряда цитокинов: так, содержание ИЛ-1 β в опухоли и в ПЗ и ИЛ-10 в опухоли было выше при II и III стадиях по сравнению с I; уровень ИЛ-6 в опухоли при III стадии был выше, чем в I. Некоторые различия в зависимости от стадии отмечались и в ткани ЛР: содержание ИЛ-10 и TNF- α было выше в этих образцах при III стадии по сравнению с I стадией.

Интересно, что показатели локального иммунитета у больных с различной локализацией опухоли (в средне-грудном и ниже-грудном отделах пищевода) также были различными. Так, статистически достоверные различия ($p < 0,05$) отмечены в количестве НКТ-клеток и НК-лимфоцитов в опухоли и ЛР; оба показателя превышали аналогичные в случаях более каудальной локализации карциномы ($9,2 \pm 1,4$ и $4,6 \pm 1,1\%$ соответственно для НКТ-клеток и $25,8 \pm 4,4$ и $11,7 \pm 3,5\%$ для НК-клеток; в обоих случаях). Кроме того, при расположении опухоли в ниже-грудном отделе пищевода отмечены также различия между опухолью и неопухолевыми тканями в уровнях и других цитокинов. Так, при локализации карциномы в наиболее нижнем отделе пищевода выявлены статистически достоверные различия между тканью опухоли и ПЗ по содержанию ИЛ-1 β ($73,0 \pm 13,5$ и $28,6 \pm 8,0$ пг/мл/г белка соответственно), между опухолью и тканью ЛР по содержанию ИЛ-6 ($43,7 \pm 12,7$ и $13,0 \pm 3,6$ пг/мл/г белка соответственно). В свою очередь статистически достоверные различия ($p < 0,05$) были выявлены для уровней ИЛ-8 во всех исследованных препаратах: $95,0 \pm 12,8$ в опухоли, $23,9 \pm 5,7$ в ПЗ и $18,8 \pm 4,1$ пг/мл/г белка в ЛР. Аналогичные, но менее выраженные изменения изученных показателей отмечены и для средне-грудной локализации рака пищевода, и они не были статистически значимыми.

В то же время при локализации опухоли в средне-грудном отделе пищевода в тканях ЛР выявлено более высокое содержание ИЛ-1 β по сравнению с аналогичными показателями для более каудальной локализации карциномы ($23,5 \pm 5,8$ и $13,5 \pm 2,2$ пг/мл/г белка соответственно, $p < 0,05$). Таким образом, полученные данные показывают, что иммунологическое микроокружение плоскоклеточных карцином пищевода при более краниальной локализации опухолевого процесса в органе в целом может быть расценено как менее благоприятное.

Заключение. Результаты сравнительного исследования иммунологического

микроокружения плоскоклеточного рака пищевода при различных стадиях заболевания выявили, что различия в соотношениях субпопуляций лимфоцитов в эзофагеальных карциномах и неопухолевых тканях определяются статистически достоверно уже начиная с I стадии, преимущественно за счет высокого содержания T-regs в тканях опухоли. Выявленное одновременно с этим увеличение в тканях опухоли количества CD3+ и CD3+CD4+ лимфоцитов коррелировало с показателями T-regs, которые являются близкими им фенотипически. При прогрессировании опухолевого процесса от I до III стадии наблюдаемые изменения были связаны, прежде всего, с повышением содержания T-regs и цитокинов IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF- α , IL-10. Однако, напротив, уровни NK-клеток в опухоли были ниже по сравнению с образцами в неопухолевых тканях, и эта тенденция сохранялась при прогрессировании заболевания.

Различная локализация патологического очага (в средне-грудном и нижнем отделах пищевода) характеризуется некоторыми особенностями клеточного состава и концентрации цитокинов в микроокружении опухоли, что может вносить вклад в характер прогрессии заболевания. При локализации опухоли в нижнем отделе пищевода с определенной вероятностью можно говорить о более благоприятном варианте, так как в этом случае отмечается более высокое тканевое содержание NK- и NKT-клеток с реализацией противоопухолевого эффекта.

Одной из причин этого феномена может быть различие в основных этиологических причинах рака пищевода в зависимости от локализации. Среди пациентов, имеющих рак средне-грудного отдела пищевода, преобладают лица, злоупотребляющие курением и алкоголем [9], а большинство эзофагеальных карцином в нижней трети органа связано с гастроэзофагеальным рефлюкс-эзофагитом. Вследствие этого опухоли средне-грудного отдела пищевода с высокой вероятностью возникают на фоне токсического поражения печени, играющего ведущую роль в генезе NK- и NKT-клеток [10]. Полученные нами данные, которые свидетельствуют об относительно низком содержании этих субпопуляций лимфоцитов, обладающих выраженными противоопухолевыми свойствами, именно у больных раком средне-грудного отдела пищевода, предполагают возможную роль их низкого уровня, как одного из механизмов развития плоскоклеточной карциномы пищевода.

Таким образом, прогрессия рака пищевода и расположение опухоли в средне-грудном отделе способствует формированию более неблагоприятного иммунологического микроокружения и сопровождается углублением T- и NK-лимфоцитарного и цитокинового дисбаланса в опухолевой ткани, с частичным вовлечением в эти изменения перитуморальной зоны, которые могут распространяться в том числе и на ткани, отстоящие от опухоли на

достаточно большом расстоянии, в частности и на образцы линии резекции.

Список литературы

1. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. Киев: Наукова Думка, 2005. 792 с.
2. 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.
3. Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunoeediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007. Vol. 121 (1). P. 1-14. DOI:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.
4. Zhang D.K., Su X.D., Lin P. Survival analysis of patients with stage II squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus after esophagectomy. *Chin J Cancer*. 2008. Vol. 27. P. 113-118.
5. Zhang H.L., Liu R.L., Shi Y.T., Wang Z.C., Wang B.H., Li Y.J., Zhou L.Y., Ping Y.M. Analysis of the survival in patients after surgical resection of thoracic esophageal cancer. *Chin J Oncol*. 2009. Vol. 31. P. 541-545.
6. Wang Y., Wang L., Yang Q., Li J., Qi Z., He M., Yao J., Qiao X. Factors on prognosis in patients of stage pT3N0M0 thoracic esophageal squamous cell carcinoma after two-field esophagectomy. *J Can Res Ther*. 2015. Vol. 11. P. 16-23.
7. Zingg U., Montani M., Frey D.M., Dirnhöfer S., Esterman A.J., Went P., Oertli D. Tumour-infiltrating lymphocytes and survival in patients with adenocarcinoma of the oesophagus. *EJSO* 36. 2010. 670e677 *J of clin surgery*. P. 670-677.
8. Łukaszewicz-Zajac M., Mroczko B., Kozłowski M., Nikliński J., Laudański J., Szmitkowski M. Higher importance of interleukin 6 than classic tumor markers (carcinoembryonic antigen and squamous cell cancer antigen) in the diagnosis of esophageal cancer patients. *Dis Esophagus*. 2012. Vol. 25 (3). P. 242-249.
9. Mendelsohn J., Howley P.M., Israel M.A., Gray J.W., Thompson C.B. Molecular Mechanisms of Esophageal Cancer. *The Molecular Basis of Cancer PA*. 2015. P. 467-475.
10. Хаитов Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы. М., 2014. 147 с.