

Анализ ответа иммунной системы на развитие рака слизистой оболочки ротовой полости

Т. Ю. Чуксина, С. Н. Теплова, С. В. Яйцев
ГОУ ВПО ЧелГМА РОСЗДРАВА

Резюме

Данная работа посвящена вопросу исследования иммунологических аспектов патогенеза злокачественных заболеваний слизистой полости рта. Актуальность изучения иммунологических механизмов и их роли в развитии злокачественного роста продиктована неуклонным ростом данной патологии, сложностью лечения и высокой смертностью, как в нашем регионе, так и по России в целом. В статье показаны иммунологические нарушения больных с местнораспространенным раком полости рта на уровне клеточного иммунитета и изменения цитокин- и нитроксидагической регуляции.

Введение

Актуальность изучения иммунного ответа на развитие рака слизистой оболочки ротовой полости определяется неуклонным ростом злокачественных новообразований полости рта. Если общий прирост злокачественных новообразований разной локализации, по данным отечественных авторов (Чиссов В. И., Старинский В. В., 2003) составляет 1,5% ежегодно, то для опухолей ротовой полости в Южно-Уральском регионе этот прирост равен 1,7% (Важенин А. В., 2005). Данная локализация опухоли характеризуется агрессивным течением, быстрым распространением процесса и ранним метастазированием. Две трети пациентов рака ротовой полости обращаются за специализированной помощью на поздних стадиях заболевания (Важенин А. В., 2005), когда опухоль становится иноперабельной. Подобное течение может определяться разными факторами и быть связано с воздействием различных термических, химических и других повреждающих факторов на слизистую оболочку ротовой полости, способствующих канцерогенезу, а также с формированием неадекватного иммунного ответа на развитие опухоли.

Цель: анализ характера ответа иммунной системы на развитие местно распространенного рака слизистой оболочки ротовой полости для уточнения иммунологических аспектов патогенеза заболевания.

Задачи:

1. Анализ частоты и форм рака ротовой полости у обследуемого контингента
2. Определение характера иммунного ответа и цитокин- и нитроксидагической регу-

ляции на системном уровне у больных с злокачественными новообразованиями слизистой оболочки ротовой полости.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе Челябинского областного онкологического диспансера с 2004 по 2007 годы. В исследование включено 139 пациентов. Мужчин — 69%, женщин — 31%. Средний возраст пациентов составил 56 лет. Из них 89 пациентов участвовало в иммунологическом исследовании.

Клинически оценивался общий и местный статус пациента, использовался физикальный метод, современные методы визуализации.

Иммунологические методы

Материалом для иммунологических исследований служила гепаринизированная венозная кровь, полученная из локтевой вены у пациентов до лечения для оценки системного иммунитета, а также слюна для оценки мукозального иммунного ответа.

В крови определяли популяционный и субпопуляционный спектр лимфоцитов, численность лимфоцитов (CD₃, CD₄, CD₈, CD₂₂), а также число NK-клеток (CD₁₆), экспрессирующих маркеры позитивной активации (CD₂₅) и готовности к апоптозу (CD₉₅) с помощью иммунофлуоресцентного метода с моноклональными антителами производств НПО «Препарат» (г. Новгород). Определяли также число клеток с морфологическими маркерами апоптоза в прижизненной окраске ядра Hoechst 33342 (Boehringer Mannheim) с учетом на микроскопе ЛЮМАМ-И1 (Vermees I. et. Al., 2000).

В сыворотке крови пациентов определяли уровень TNF- α , INF- γ , АТ к IFN- γ , лактоферин, общий IgG, а также его субклассы IgG1-

G4 с помощью непрямого ИФА. Использовались тест-системы ЗАО «Вектор-Бест», (г. Новосибирск). Уровни конечных стабильных метаболитов оксида азота (NO_x , NO_2 , NO_3), определяли с помощью модифицированного метода Гриса в модификации Коробейниковой Э. Н. (2002). Статистическая обработка проводилась непараметрическими методами по Колмогорову-Смирнову, U-test Mann-Whitney с помощью пакета прикладных программ «Statistica vers 6.0».

Результаты и обсуждение

При анализе клинических особенностей 139 пациентов, находящихся на лечении в Челябинском областном онкологическом диспансере с местнораспространенными формами рака слизистой полости рта, установлены следующие клинические формы заболевания по классификации Пачеса А. И. (1988): в 36,4% случаев — экзофитная форма рака, в 64,6% — эндофитная форма. Распределение больных по клиническим стадиям заболевания было следующим: 1-2 стадии — 25%, 3 стадия — 36%, 4 стадия — 39% больных, табл. 1.

По локализации выделены рак языка, который встречался чаще всего и составил — 62,5%, слизистой щек — 23,7%, слизистой альвеолярного отростка — 5,8%, дна полости рта — 5%, мягкого неба — 3%.

Морфологическая верификация диагноза проводилась в 100% случаев. У 98,8% больных

верифицирован плоскоклеточный ороговевающий рак и у 1,2% — carcinoma in situ.

При проведении иммунологических исследований для выявления характера ответа иммунной системы на развитие опухоли критериями включения были местнораспространенные формы рака слизистой ротовой полости, а критериями исключения соответственно формы с отдаленными метастазами.

Результаты оценки популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов у больных с местнораспространенными формами рака ротовой полости представлены в табл. 2.

Анализируя особенности системного иммунного ответа при развитии рака ротовой полости, мы установили отсутствие достоверных различий со стороны общего количества лейкоцитов и лимфоцитов в крови у больных в сопоставлении с контрольной группой. Вместе с тем выявлены некоторые различия в содержании отдельных популяций лимфоцитов. Наиболее характерным для больных раком ротовой полости было отсутствие роста в циркуляции НК клеток, относящихся к механизмам врожденного противоопухолевого иммунитета, имеющих принципиальное значение для обеспечения противоопухолевой защиты организма, напротив, число этих клеток оказалось достоверно сниженным в сопоставлении с группой контроля.

Установлено также достоверное снижение числа CD_3 клеток у больных в сравнении с кон-

Таблица 1. Распределение больных раком полости рта по стадиям

Пол	I-II ст., % больных	III ст., % больных	IV ст., % больных	Итого, % больных
Женщин	8	13	10	31
Мужчин	19	23	27	69
Всего	25	36	39	100

Таблица 2. Показатели популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов и процессы апоптоза у пациентов с местнораспространенными злокачественными новообразованиями слизистой полости рта

Показатели	Группа больных, n=10	Контрольная группа, n=30	P
Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	7,35 \pm 0,36	6,38 \pm 0,39	-
Лимфоциты, (%)	36,5 \pm 1,84	32,9 \pm 2,33	-
$\text{CD}_3 \times 10^9/\text{л}$	0,70 \pm 0,17	1,06 \pm 0,06	0,02
$\text{CD}_4 \times 10^9/\text{л}$	0,60 \pm 0,07	0,63 \pm 0,02	-
$\text{CD}_8 \times 10^9/\text{л}$	0,48 \pm 0,08	0,42 \pm 0,02	-
CD_4/CD_8	1,42 \pm 0,06	1,51 \pm 0,03	-
$\text{CD}_{22} \times 10^9/\text{л}$	0,31 \pm 0,04	0,36 \pm 0,03	-
$\text{CD}_{25} \times 10^9/\text{л}$	0,20 \pm 0,03	0,27 \pm 0,08	-
$\text{CD}_{16} \times 10^9/\text{л}$	0,32 \pm 0,1	0,38 \pm 0,03	0,01
$\text{CD}_{95} \times 10^9/\text{л}$	0,28 \pm 0,04	0,24 \pm 0,05	-
Апоптоз (морфологически выявленный)	0,08 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,03
$\text{CD}_{25}/\text{CD}_{95}$	0,7	1,12	0,002

Таблица 3. Уровни показателей цитокин- и нитроксидазной регуляции в крови у больных раком полости рта

Показатели		Группа здоровых, n=25		Группа больных, n=24		P
		Me	Q25 - Q75	Me	Q25 - Q75	
IFN- γ	пкг/мл	14,05	11,7-17,57	4,72	0,05-7,71	0,003
AT IFN- γ		1,09	0,36-2,0	2,04	0,00-3,66	
TNF- α		1,43	1,25-1,90	6,82	3,58-29,5	
LF нг/мл, (лактоферрин)		2920,5	1587,0-3547,0	3790	3084,9-4269,3	
NO ₂ , мкмоль/л		5,10	4,58-6,90	4,60	3,15-6,30	
NO _x , мкмоль/л		19,1	16,3-20,7	24,8	20,55-38,30	0,0001
NO ₃ , мкмоль/л		13,95	9,4-15,6	20,05	14,5-23,65	0,001

трольной группой ($p=0,02$), что может отражать уменьшение пролиферации этих клеток, усиление их апоптоза или уход Т лимфоцитов в очаги опухолевого роста. Действительно, у больных раком слизистой оболочки полости рта обнаружено существенное, с высокой степенью достоверности снижение соотношения клеток с маркерами позитивной и негативной активации (CD₂₅/CD₉₅) в сопоставлении с контрольной группой. Это снижение происходит за счет тенденции к уменьшению в циркуляции у больных лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней позитивной активации (CD₂₅) и тенденции роста, не достигающей степени статистической достоверности, числа клеток, экспрессирующих рецепторы готовности к апоптозу (CD₉₅). В исследуемой группе больных обнаружено достоверное снижение числа клеток с морфологическими признаками апоптоза в сравнении с контрольной группой ($p=0,03$). В целом полученные данные позволяют с большой долей вероятности предполагать, что уменьшение числа CD₃ лимфоцитов в циркуляции в основном связано с тенденцией к уменьшению процессов позитивной активации лимфоцитов, которое не компенсируется уменьшением процессов апоптоза лимфоцитов.

Полученные данные отражают нарушения численности клеток врожденного противоопухолевого иммунитета (NK), а также CD₃ лимфоцитов, обеспечивающих адаптивный клеточный иммунный ответ у больных раком ротовой полости.

В табл. 3 представлены показатели цитокин- и нитроксидазной регуляции у больных раком полости рта.

Анализ цитокин- и нитроксидажной регуляции показал достоверное увеличение TNF- α в крови пациентов с опухолевым поражением ротовой полости, что отражает ответ клеток-продуцентов (макрофагов) цитокина на развитие опухоли. Достоверных изменений уровня IFN- γ , антител к нему не обнаружено.

Вместе с тем, в крови у пациентов с раком полости рта обнаружен достоверный рост оксида азота, оцениваемый по конечным стабильным метаболитам NO, продуцентов которых могут быть макрофаги и эндотелиоциты. Рост уровня NO может отражать усиление внутриклеточного цитотоксического потенциала макрофагов с одной стороны, и вазодилатационный эффект этого мессенджера — с другой (Роум М. Я., 2001)

Таким образом, полученные данные отражают нарушения численности клеток врожденного противоопухолевого иммунитета (NK), а также CD₃ лимфоцитов, обеспечивающих адаптивный клеточный иммунный ответ, изменения цитокин- и нитроксидажной регуляции на системном уровне при местнораспространенном опухолевом росте в ротовой полости.

Литература

1. David Male, Jonathan Brostoff. Immunology; 2006.
2. Новиков В. И., Карандашов В. И., Сидорович И. Г. Иммуноterapia при злокачественных новообразованиях. М: Медицина; 2002; 160.
3. Дейчман Г. И. Опухолевые антигены и противоопухолевый иммунитет. В: Заридзе Д. Г. (ред.) Канцерогенез. М.; 2000; 315-330.
4. Garderet L., Snell V., Przepiorka D. et al. Effective depletion of alloreactive lymphocytes from peripheral blood mononuclear preparations. Transplantation, 1999; 67(1): 124-129.
5. Fallarino F., Grohman U., Bianchi R. et al. Th1 and Th2 cell clones to a poorly immunogenic tumor antigen initiate CD8+ T-cell-dependent tumor eradication in vivo, Ibid. 165. №10: 5495-5501.
6. Бережная Н. М. Чехун В. Ф. Система интерлейкинов и рак — Киев: ДИА, 2000-224.
7. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self?, Annu. Rev. Immunol. 2003; 21: 807-839.
8. Whiteside T. L. Immune responses to malignancies, J. Allergy and Clin. Immunol. 2003; 111-N2: 677-686.
9. Scavelli C., Vacca A., Di Pietro G. et al. Crosstalk between angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor progression. Leukemia. 2004 18, N6: 1054-1058.
10. Rosenberg S. A., Yang J. C., Restifo N. P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nat. Med. 2004; 10, N10: 909-915.
11. А. Райт, Дж. Бросторд, Д. Мэйл. Иммунология. Мир; 2000.