УДК 618.19-006.6+616-018

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В СТРОМЕ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

¹Таширева Л.А., ^{1,2}Завьялова М.В., ^{1,3}Савельева О.Е., ^{1,2}Вторушин С.В., ^{1,2,3}Кайгородова Е.В., ^{1,3}Денисов Е.В., ^{1,2}Слонимская Е.М., ^{1,2}Перельмутер В.М.

¹ΦΓБНУ Томский НИИ онкологии, Томск, e-mail: tashireva@oncology.tomsk.ru; ²ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск; ³Научно-исследовательский Томский государственный университет, Томск

В представленном исследовании нами проводилась оценка распределения лейкоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов в строме различных морфологических структур инвазивного компонента рака молочной железы неспецифического типа, а также их связь с прогрессией опухоли. Методом иммуногистохимии определены клетки, экспрессирующие на своей мембране CD3, CD45LCA и CD8, располагающиеся вблизи структур опухоли, а также в отдалении от таковых. Была определена связь наличия определяемых клеток с лимфогенным и гематогенным метастазированием, а также рецидивированием. Было показано, что для прогнозирования развития гематогенных, но не лимфогенных метастазов, а также рецидивирования имеет значение выявление цитотоксических Т-лимфоцитов в стромальном окружении дискретно расположенных опухолевых клеток, а также в инфильтрате в отдалении от каких-либо опухолевых структур.

Ключевые слова: цитотоксические Т-лимфоциты, морфологическая гетерогенность, рак молочной железы

HETEROGENEOUS DISTRIBUTION OF CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTES IN THE STROMA OF INVASIVE BREAST CARCINOMA: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE

¹Tashireva L.A., ^{1,2}Zavyalova M.V., ^{1,3}Savelieva O.E., ^{1,2}Vtorushin S.V., ^{1,2,3}Kaigorodova E.V., ^{1,3}Denisov E.V., ^{1,2}Slonimskaya E.M., ^{1,2}Perelmuter V.M.

¹Tomsk Cancer research institute, Tomsk, e-mail: tashireva@oncology.tomsk.ru; ²Siberian state medical university, Tomsk; ³Tomsk state university, Tomsk

In the present study evaluated the distribution of leukocytes and cytotoxic T-lymphocytes in the stroma of various morphological structures of the invasive component of the breast cancer (IC NST) and association with tumor progression. Determined by immunohistochemistry CD3 +, CD45LCA + and CD8 + cells which are located near the tumor entities, as well as from those in the distance. Was determined relationship between presence of cytotoxic T-lymphocytes in the microenvironment of the discrete tumor cells, as well as in infiltrate the distance of any tumor structures and hematogenous, but not lymph node metastasis, and recurrence.

Keywords: cytotoxic T-lymphocytes, morphological heterogeneity of breast cancer

Рак молочной железы не перестает занимать лидирующие позиции среди онкологических заболеваний у женщин [4]. Те или иные формы прогрессии зачастую становятся причиной гибели. В настоящее время актуальным является поиск новых подходов к прогнозированию течения этого заболевания. Известно, что ключевым фактором метастатического потенциала опухоли является состояние его микроокружения. Kohrt et al. [2005] показали, что при раке молочной железы присутствие опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в высоком $\hat{C}D4+\hat{C}D8+$ и Th2/Th1 соотношении является плохим прогностическим показателем [6]. J. Galon et al. ввели такое понятие как Immunoscore, где в качестве прогностического признака используется определение соотношения CD3/CD8 в инвазивном крае и центре опухоли [5]. Дальнейшие исследования подтверждали показанное ранее, так, при масштабных исследованиях транскриптома опухоли было продемонстрировано, что благоприятным для исхода болезни является местный Th1ответ, ведущий к цитотоксическому уничтожению клеток опухоли [7]. Однако в литературе встречаются и противоположные данные, возможно, в силу явления внутриопухолевой гетерогенности [2], одним из проявлений которой является морфологическая гетерогенность [1]. Ранее было показано, что наличие различных морфологических структур в опухоли молочной железы имеет разное прогностическое значение и связь с вариантами прогрессии [3]. В настоящей работе было изучено наличие и распределение цитотоксических Т-лимфоцитов в строме различных структур инвазивного компонента рака молочной железы, а также проанализирована связь с прогрессией опухоли (рецидивированием, лимфогенным и гематогенным метастазированием).

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 54 больных с инвазивным раком молочной железы неспецифического типа в возрасте от 37 до 80 лет, средний возраст составил 54,9 ± 9,7 года. Пациенты были разделены на четыре группы: 1 – без каких-либо форм прогрессии (n = 16), 2 - с лимфогенным метастазированием (n = 9), 3 - с гематогенным метастазированием (n = 8), 4 - c наличием рецидива (n = 7). Предоперационного лечения больные не получали. Среди пациентов 59.5% имели люминальный А тип. 14.3% – люминальный В тип, 16,7% - трижды негативный тип, 9,5% - тип с гиперэкспрессией Her2neu. Всем больным проводилась операция в размере радикальной мастэктомии и секторальной резекции молочной железы. По соотношению разных молекулярно-генетических типов и вида проведенного хирургического лечения группы не различались. Образцы тканей фиксировались в 10% нейтральном формалине. Материал обрабатывался по стандартной методике и заливался в парафин. Морфологическое исследование операционного материала осуществлялось по стандартной методике с использованием светового микроскопа «CarlZeissAxio Lab.A1». Гистологический тип рака устанавливался согласно рекомендациям ВОЗ (Женева, 2012). Наличие цитотоксических Т-лимфоцитов в строме опухоли оценивали по иммуногистохимическому окрашиванию клеток, формирующих микроокружения тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных структур и дискретно расположенных групп клеток (ГК), антителами против CD45, CD3, CD8. При исследовании применяли антитела фирмы «Dako» к CD 3 (клон UCHT1, рабочее разведение 1:100), к СD8 (клон С8/144В, рабочее разведение 1:100),фирмы «Biogenex» к CD45LCA (клон PD7/26/16&2B1, RTU, мышиные). Экспрессию CD 45, CD 3, CD 8 в клетках воспалительного инфильтрата оценивали полуколичественно (0 баллов - отсутствие; 1 балл – 1–5 клеток; 2 балла – 6–20 клеток; 3 балла – более 20 клеток) вблизи каждого варианта структур паренхиматозного компонента опухоли (не далее чем на 2 диаметра малого лимфоцита), а также в строме новообразования в отдалении от паренхиматозных структур. Отдаленные результаты оценивались через 5 лет. Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ «Statistica 6.0 for Windows». Проверка на соответствие нормальному закону распределения проводилась с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для проверки гипотезы применялся критерий Краскала-Уолиса. Результаты считались достоверными при р < 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Подсчитанное в соответствии с рекомендациями J. Galon et al. соотношение CD3/CD8 оказалось выше в группе пациенток с рецидивами рака молочной железы в сравнении со случаями без прогрессии болезни. Причем результат не зависел от того проводился ли подсчет количества соответствующих лимфоцитов в случайных полях зрения или в отдалении от опухолевых структур (соответственно: 0.911 ± 0.946 и 1.260 ± 0.240 , p = 0.003; 0.940 ± 0.150

и $1,430 \pm 0,730$, p = 0,006). При анализе общего количества CD45LCA+ лейкоцитов и CD8+ лимфоцитов в воспалительном инфильтрате в зависимости от формы прогрессии были обнаружены достоверные различия. Показано, что наличие CD45LCA+ лейкоцитов и CD8+ лимфоцитов в инфильтрате вне зависимости от типа морфологических структур было достоверно выше в группе пациентов без рецидива (3,05 (2,55–3,95) и 2,80 (2,00–3,30) усл.ед., соответственно) по сравнению с группой пациентов, имеющих рецидив (2,12 (1,76–2,71) и 1,50 (1,20–2,22) усл.ед., соответственно) (p = 0,008 и p = 0,027, соответственно).

Далее, для того, чтобы определить вклад морфологической гетерогенности опухоли в выявленные различия, нами было определено содержание CD3+, CD45LCA+, CD8+ клеток и соотношение CD3/CD8 в воспалительном инфильтрате вблизи каждого из пяти типов структур инфильтративного компонента опухоли (тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных и дискретно расположенных групп клеток) в зависимости от формы прогрессии. Было обнаружено, что в группе больных без рецидива количество CD45LCA+ и CD8+ клеток в инфильтрате вокруг ГК и CD8+ клеток в инфильтрате в отдалении от опухолевых структур повышалось (3,00 (2,00-4,00); 3,00 (2,50-4,00) и 4,00 (3,00-4,00) усл.ед., соответственно) по сравнению с аналогичными показателями группы больных с наличием рецидивов (2,00 (1,00-2,00); 1,00 (1,00-2,00) и 2,00 (2,00-2,75) усл.ед., соответственно) (p = 0.011, p = 0.019 и p = 0.001, cootbetственно). С наличием гематогенных метастазов было ассоциировано достоверное снижение количества CD45+ и CD8+ лимфоцитов до 1,00 (1,00-2,00) и 1,00 (1,00-2,00) усл. ед., соответственно, вблизи дискретно расположенных опухолевых клеток (р = 0,018 и p = 0.017, соответственно). Соотношение CD3/CD8 вблизи разных структур не различалось в группах с наличием рецидивов или гематогенных метастазов в сравнении с контрольной группой (p > 0.05).

Лимфогенное метастазирование не было связано с инфильтрацией стромы CD3+, CD45LCA+ и CD8+ клетками (p > 0.05).

Заключение

Предлагаемое соотношение CD3/CD8 оказалось эффективным только для прогноза рецидивов. Причем такой прогноз не зависел от морфологической гетерогенности опухоли. Оказалось, что для оценки риска возникновения рецидивов и гематогенных метастазов опухоли достаточно определение CD45LCA+ или CD8+ клеток в ми-

кроокружении дискретно расположенных опухолевых клеток и CD8+ клеток в инфильтрате в отдалении от каких-либо опухолевых структур. Из всех типов структур инвазивного компонента опухоли, только характер иммуно-воспалительной инфильтрации вблизи дискретно расположенных опухолевых клеток оказался связанным с рецидивированием и гематогенным, но не с лимфогенным метастазированием. Выявленное снижение инфильтрации лейкоцитами и количества цитотоксических Т-лимфоцитов в строме опухоли у пациентов, имеющих рецидив или гематогенные метастазы, может свидетельствовать в пользу важной роли дискретных опухолевых клеток и иммуно-воспалительной реакции Th1-CD8 типа в развитии и торможении рецидивирования и метастазирования инвазивного рака молочной железы неспецифического типа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке $P\Phi\Phi U$ в рамках научного проекта N 15-34-20864 мол а вед.

Список литературы

1. Геращенко Т.С. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивного протокового рака молочной

- железы: формирование и молекулярно-генетические особенности / Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Таширева Л.А., Литвяков Н.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. // Медицинский академический журнал. 2012.-T.12, № 4.-C.66-68.
- 2. Геращенко Т.С. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение (обзор) / Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. // Биохимия. 2013. Т. 78, № 11. С. 1531–1549.
- 3. Перельмутер В.М. Взаимосвязь морфологической гетерогенности инфильтрирующего протокового рака молочной железы с различными формами опухолевой прогрессии / Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Савенкова О.В. // Сибирский онкологический журнал. − 2007. № 3. С. 58–63.
- 4. Тамкович С.Н. Современные методы диагностики рака молочной железы / Тамкович С.Н., Войцицкий В.Е., Лактионов П.П. // Биомедицинская химия. 2014. N 2. C 141–161
- 5. Galon J. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force / Galon J., Pages F., Marincola F.M., et al. // J Transl Med. -2012. $-N_2$ 10. -P. 205.
- 6. Kohrt H.E. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer / Kohrt H.E., Nouri N., Nowels K., Johnson D., Holmes S., Lee P.P. // PLoS Med. -2005. N0 2(9).
- 7. Sabatier R. A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer / Sabatier R., Finetti P., Cervera N., Lambaudie E., Esterni B., Mamessier E., Tallet A., Chabannon C., Extra J.M., Jacquemier J., Viens P., Birnbaum D., Bertucci F. // Breast Cancer Res Treat. 2011. − № 126(2). C. 407–20. doi: 10.1007/s10549-010-0897-9.