

УДК 616-006.61

РОЛЬ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ГОЛОВЫ И ШЕИ

^{1,2}Кутукова С.И., ²Беляк Н.П., ^{1,2}Манихас Г.М., ¹Яременко А.И., ³Раскин Г.А.

¹ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздравоохранения России», Санкт-Петербург, e-mail: dr.s.kutukova@gmail.com;

²СПб ГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер», Санкт-Петербург, e-mail: drnpb@mail.ru;

³ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, e-mail: raskinga@gmail.com

Целью нашего исследования стало изучение корреляционных взаимодействий опухолевого и стромального микроокружения (инфильтрации CD8(+) Т-лимфоцитами, нейтрофилами и эозинофилами) с одной стороны, и клинико-морфологическими характеристиками и показателями выживаемости, с другой стороны, у пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи. В проспективном исследовании были проанализированы истории болезни и образцы опухолевой ткани 18 пациентов с ПРГШ I – IVB стадии (10 мужчин, 8 женщин, медиана возраста – 64 года). Все пациенты получали стандартный протокол комплексного лечения. Период наблюдения – с 2010 по 2015 год. Были изучены клинические (демографические характеристики, локализация и стадия процесса), морфологические (нейтрофильная и эозинофильная инфильтрация опухоли и ее стромы) и иммуногистохимические (инфильтрация СВ8(+) Т-лимфоцитами) показатели, а также их влияние на ОВ и ВБП. Проведенное исследование показало, что иммунологическое микроокружение (уровень экспрессии CD8(+) Т-лимфоцитов, и инфильтрация нейтрофилами и эозинофилами) является значимым прогностическим фактором течения плоскоклеточного рака головы и шеи.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта, CD8(+) Т-лимфоциты, микроокружение, нейтрофильная и эозинофильная инфильтрация

TUMOR MICROENVIRONMENT IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

^{1,2}Kutukova S.I., ²Beliak N.P., ^{1,2}Manikhas G.M., ¹Yaremenko A.I., ³Raskin G.A.

¹First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg, Saint-Petersburg, e-mail: dr.s.kutukova@gmail.com;

²City clinical oncology dispensary, Saint-Petersburg, e-mail: drnpb@mail.ru;

³Russian scientific radiological and surgical technology center, Saint-Petersburg, e-mail: raskinga@gmail.com

The purpose of our study was to investigate some correlation between tumor and microenvironment infiltration by CD8(+) T-cells, eosinophils, neutrophils expression, on the one hand, and clinical parameters, treatment options and OS, PFS for patients with HNSCC, on the other hand. In the prospective study medical records and tumor samples of 18 patients with HNSCC with stage I – IVB (10 men, 8 women; median age 64) were analyzed. All patients were under standard clinical complex protocol. All patients were under our supervision from 2010 to 2015. Demographic data, clinical stage, tumor morphological characteristics and specific level of expression of CD8(+) T-cells, eosinophils and neutrophils in the tumor and microenvironment were examined. Definition of intratumoral expression of CD8(+) T-cells and infiltration of eosinophils and neutrophils could be informative prognostic factors for patient with HNSCC.

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma, CD8(+) T-cells, microenvironment, neutrophil's and eosinophil's infiltration

Актуальность вопроса

Злокачественная опухоль – это динамическая система, которую следует рассматривать в комплексе со всеми морфологическими составляющими, формирующими ее микроокружение: клетки стромы, клетки системы иммунитета, кровеносные, лимфатические сосуды и экстрацеллюлярный матрикс [1, 2].

Инфильтрирующие опухоль клетки иммунной системы в последнее время являют-

ся объектом пристального внимания ученых [3, 4, 5]. Им отводится ключевая роль в концепции «противоопухолевого иммунитета». Многообразие субпопуляций этих клеток, продуктов их синтеза и путей взаимодействия может объяснять их возможное диаметрально противоположное действие: от механизмов противоопухолевой защиты до стимуляции прогрессии канцерогенеза.

Хроническое воспаление, по данным литературы, повышает риск развития опухоли

и потенцирует ее прогрессирование [6]. Однако, некоторые формы асептического воспаления могут быть факторами противоопухолевой защиты и индуцироваться в ответ на злокачественную инвазию. Основным участником воспаления являются нейтрофилы, которые в нашей работе оценивались количественно в строме опухоли и микроокружении.

Эозинофилы также оказывают разнонаправленное действие. С одной стороны они активно взаимодействуют с клетками в участках воспаления, с другой стороны появились данные, свидетельствующие, что активированные эозинофилы секретируют хемоаттрактанты, которые «дирижируют» Т-лимфоцитами, направляя их в опухоль, а также изменяют микроокружение путем поляризации макрофагов и способствуют нормализации васкуляризации [7, 8].

Роль натуральных киллеров в опухоли довольно широко изучена [9, 10, 11, 12]. Инфильтрация опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами в настоящее время является одним из ключевых факторов прогнозирования течения опухолевого процесса, а также рассматривается в качестве предиктора эффективности иммунотерапии [13].

Целью данной работы стало изучение количественных соотношений нейтрофилов, эозинофилов и цитотоксических Т-лимфоцитов в строме опухоли и ее ближайшем микроокружении в аденокарциномах желудочно-кишечного тракта и эпителиальных опухолях головы и шеи, корреляция их выявляемости с течением опухолевого процесса и эффективностью лечения.

Материалы и методы исследования

Под нашим наблюдением находилось 18 пациентов, проходивших лечение в СПб ГБУЗ «Городской клинически онкологический диспансер» с диагнозом: плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта и орофарингеальной зоны. В исследовании приняли участие 8 женщин и 10 мужчин, в возрасте от 44 до 84 лет, медиана возраста составила 64 года (СІ 95% от 60,2325 до 71,8786, $p < 0,0001$).

У 7 пациентов первичный опухолевый очаг локализовался в области боковой поверхности передней или средней трети языка, у 4 пациентов первично была поражена задняя треть языка, 4 имели поражение слизистой оболочки дна полости рта, у 2 диагностировано поражение альвеолярной части нижней челюсти и 1 пациент страдал наличием опухоли в области слизистой оболочки крыло-челюстной складки.

После стандартного обследования и стадирования у 2 пациентов зарегистрирована I стадия заболевания (T1N0M0), у 3 пациентов – II стадия (T2N0M0), III стадия – у 2 пациентов (1 – T1N1M0, 1 – T2N1M0), у остальных 11 пациентов была зарегистрирована IV стадия опухолевого процесса (2 – T4N1M0, 9 – T4N2M0).

При морфологическом исследовании у 10 пациентов была выявлена высокая дифференцировка опухоли, у 3 она была умеренная, и у 2 – низкая; у 3 пациентов дифференцировка опухолевого процесса не была определена. У 11 больных были выявлены гистологические признаки ороговения, у 4 данных за наличие ороговения не получено и у 3 – данный показатель не определен.

У 15 из 18 пациентов было проведено исследование нативной опухолевой ткани на содержание в ней вирусной ДНК или РНК с помощью метода ПЦР. были определены следующие виды вирусов: HSV I и II типов, EBV, CMV, HPV 6,11 типов, HPV 16 типа и HPV 18 типа.

Ни в одном, из исследуемых образцов не были обнаружены следы HSV I и II типов, CMV, а также HPV 16 типа. У 4 пациентов было зарегистрировано наличие EBV, у 3 – HPV 6,11 типов и у 2 – HPV 18 типа. Причем у 1 пациента было выявлено наличие EBV и HPV 18 типа, и у 1 – HPV 6,11 типов и HPV 18 типа.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенное ИГХ-исследование иммунофенотипа опухоли и микроокружения показало следующие результаты.

Показатель нейтрофильного звена микроокружения варьировал в пределах от 5 до 1000 клеток в кв.мм. (8 стандартных полей зрения): средний показатель составил $266,0556 \pm 67,6979$ (95% СІ от 23,2255 до 308,8856; $p < 0,0257$); медиана количества нейтрофилов составила 34,5 кв.мм. (95% СІ от 18,7947 до 107,6158).

Эозинофильный компонент варьировал в пределах от 0 до 872 клеток в кв.мм., причем только у 1 пациента достиг максимального предела (872 клетки), у остальных 17 данный компонент значения распределился следующим образом: у 7 пациентов эозинофилы выявлены не были, у 2 пациентов были выявлены 3 и 4 клетки соответственно, у 2 пациентов количество эозинофилов составило 16 клеток, и у остальных 7 пациентов зарегистрировано 29, 39, 48 и 53 клетки в 1 кв.мм. Средний показатель количества эозинофилов и его медиана были рассчитаны без учета экстремально высокого уровня клеток (872) и составили: среднее количество эозинофилов – $12,8824 \pm 4,4108$ клеток (95% СІ от 3,5319 до 22,2328; $p = 0,01$), медиана – 3 клетки (95% СІ от 0,0000 до 16,0000).

Экспрессия CD8 колебалась в пределах от 190 до 1380 клеток/кв.мм., средний показатель составил $551,2778 \pm 80,7383$ (95% СІ от 380,9349 до 721,6207; $p < 0,0001$), медиана – 542,5000 (95% СІ от 250,3315 до 763,1692).

Исследование корреляционных зависимостей позволило обнаружить следующие закономерности.

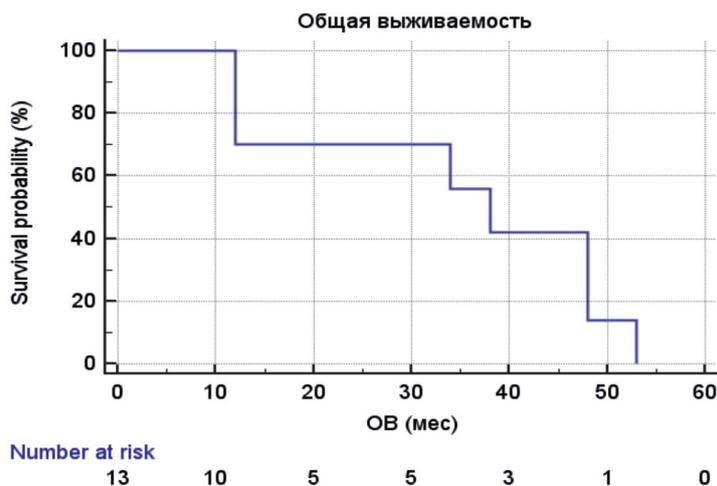


Рис. 1. Общая выживаемость (OB) пациентов в плоскоклеточном раке головы и шеи

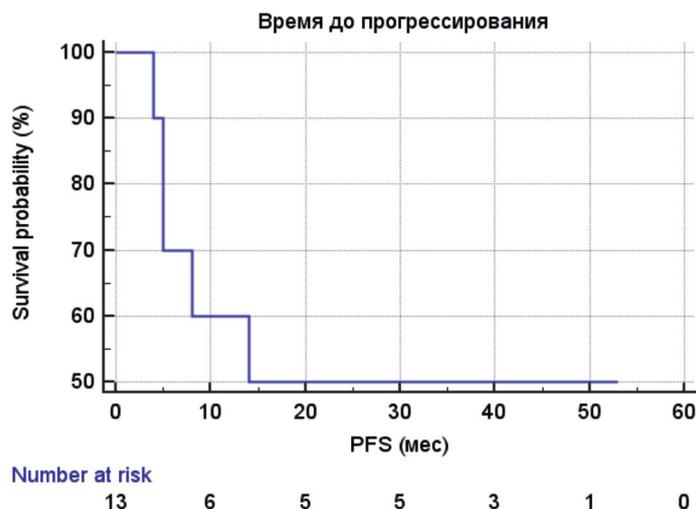


Рис. 2. Время без прогрессирования (PFS) пациентов в плоскоклеточном раке головы и шеи

Количество нейтрофилов обратно коррелирует с наличием ороговения опухоли, $r = -0,6327$ (95 % CI от $-0,8647$ до $-0,1783$; $p = 0,0114$).

Количество эозинофилов в данной группе пациентов не показало корреляции с характеристиками опухолевого процесса пациентов.

Экспрессия CD8 обратно коррелировала с размером первичного опухолевого очага (критерий Т), $r = -0,5332$ (95 % CI от $-0,8008$ до $-0,08836$; $p = 0,0227$) и стадией опухолевого процесса, $r = -0,4756$ (95 % CI от $-0,7712$ to $-0,01118$; $p = 0,0461$) и имела прямое корреляционное взаимоотношение

с наличием ороговения опухоли $r = 0,5368$ (95 % CI от $0,03382$ to $0,8228$; $p = 0,0391$).

Сравнение показателей иммунофенотипа опухоли и ее микроокружения между собой на данной выборке достоверных корреляционных зависимостей не выявило.

Нами была оценена общая и безрецидивная выживаемости пациентов с использованием модели Kaplan-Meier: медиана общей выживаемости составила 38 месяцев (95 % CI от $12,000$ до $48,000$); медиана времени до прогрессирования составила 14 месяцев (95 % CI от $5,000$ до $14,000$).

Также нами был проведен многофакторный (с использованием модели Кокса) анализ влияния количественных показателей наличия нейтрофилов, эозинофилов и экспрессии CD8 на общую выживаемость пациентов и на время до прогрессирования заболевания. Достоверных влияний пока не выявлено, что вероятнее всего связано с малым объемом выборки, однако о тенденции к влиянию на общую выживаемость говорить уверенно можно, что, безусловно подтверждает прогностическую ценность этих показателей.

На общую выживаемость вероятность влияния экспрессии CD8 составила $p = 0,1655$ (95 % CI of Exp(b) от 0,9794 до 1,0035), вероятность влияния нейтро-

фильного компонента – $p = 0,1546$ (95 % CI of Exp(b) от 0,9951 до 1,0008), а эозинофильного – $p = 0,2242$ (95 % CI of Exp(b) от 0,9972 до 1,0122). Общий уровень значимости модели Кокса составил $p = 0,1368$.

На время до прогрессирования вероятность влияния малозначительна: значимость экспрессии CD8 составила $p = 0,6887$ (95 % CI of Exp(b) от 0,9943 до 1,0038), вероятность влияния нейтрофильного компонента – $p = 0,9759$ (95 % CI of Exp(b) от 0,9963 до 1,0036), а эозинофильного – $p = 0,4248$ (95 % CI of Exp(b) от 0,8689 до 1,0607). Общий уровень значимости модели Кокса составил $p = 0,4328$.

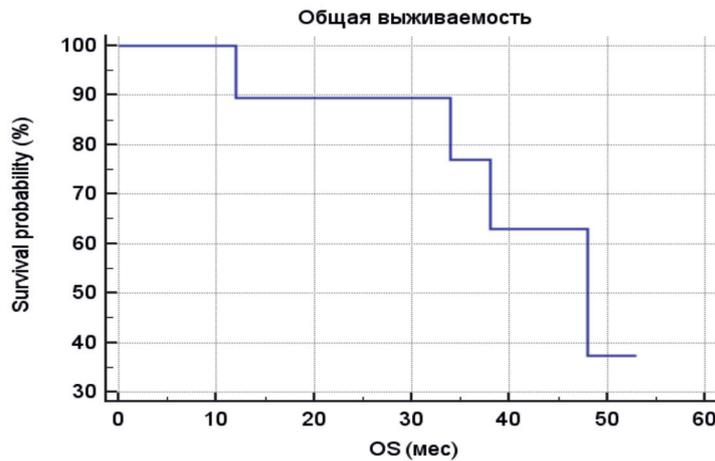


Рис. 3. Влияние экспрессии CD8, нейтрофильной и эозинофильной инфильтрации на общую выживаемость (модель Кокса)

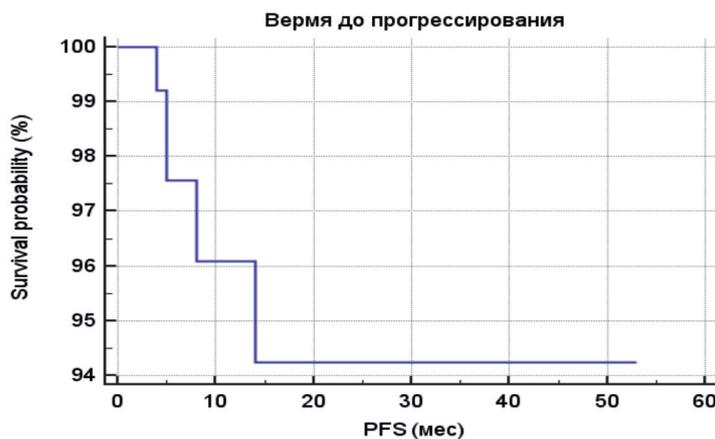


Рис. 4. Влияние экспрессии CD8, нейтрофильной и эозинофильной инфильтрации на время без прогрессирования (модель Кокса)

Заключение

Проведенное нами исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Анализ инфильтрирующих строму и микроокружение лимфоцитов показал, что плоскоклеточный рак головы и шеи являются весьма гетерогенными по данному признаку.

2. В плоскоклеточных эпителиальных опухолях головы и шеи количественный показатель инфильтрирующих лимфоцитов оказывает влияние на показатели общей и безрецидивной выживаемости пациентов.

3. Проведенный корреляционный анализ позволил выявить прогностическую и предиктивную ценность иммунологического микроокружения опухоли (особенно плоскоклеточного рака головы и шеи), поскольку уверенно показал влияние экспрессии CD8 Т-лимфоцитов, нейтрофилов и эозинофилов на клиническое течение заболевания и степень ответа на проводимую терапию.

Список литературы

1. Бережная Н.М. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения // Онкология. – 2009. – Т. 1, № 2. – С. 86–93.
2. Mantovani A., et al. Tumor immunity: effector response to tumor and role of the microenvironment. *Lancet* 2008; 371(9614):771-83.
3. Тупицын Н.Н. Иммунофенотип рака молочной железы // Рак молочной железы / Под ред. Н.Е. Кушлинского, С.М. Портного, К.П. Лактионова. – М.: Издательство РАМН, 2005. – С.174–197.
4. Balch C., Riley L., Bae T. et al. Patterns of human tumor infiltrating lymphocytes in 120 human cancers // *Arch. Surg.* 1990. Vol.125(2). P.200–205.
5. Galon J., Pages F., et al. Cancer classification using the immunoscore: a worldwide task force. *J. Transl Med* 10: 205, 2012.
6. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917):860-7.
7. Zagai U., et al. The effect of eosinophils on collagen gel contraction and implications for tissue remodeling. *Clin. Exp Immunol* 2004; 135(3): 427-33.
8. Carretero R. et al. Granulocytes: Eosinophils enable the antitumour T cell response.. *Nat Immunol.* 2015 Jun;16(6):609-17. doi: 10.1038/ni.3159. Epub 2015 Apr 27.
9. Ali HR et al. *Ann Oncol* (2014) 25 (8): 1536-1543.
10. Ladányi A. Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 Mar 26. doi: 10.1111/pcmr.12371.
11. Sconocchia G. et al. NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer. *Oncoimmunology.* 2014 Aug 3;3(8):e952197.
12. D'Angelo SP. et al. Prevalence of tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in the soft tissue sarcoma microenvironment. *Hum Pathol.* 2015 Mar;46(3):357-65. doi: 10.1016/j.humpath.2014.11.001. Epub 2014 Nov 15.
13. Djenidi F. et al. CD8+CD103+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Tumor-Specific Tissue-Resident Memory T Cells and a Prognostic Factor for Survival in Lung Cancer Patients. *J. Immunol.* 2015 Apr 1;194(7):3475-86. doi: 10.4049/jimmunol.1402711. Epub 2015 Feb 27