

Семенова А.Б.^{1,2}, Казачков Е.Л.¹, Долгушин И.И.¹, Важенин А.В.^{1,2}

Воспалительно-клеточный инфильтрат в опухоли и параканкротической зоне при инвазивных карциномах молочной железы с неблагоприятным клиническим прогнозом (HER2-позитивный и тройной негативный типы новообразования)

1- ГБОУ ВПО ЮУМУ Минздрава России, г. Челябинск; 2 - ГБУЗ «ЧОКОД», г. Челябинск

Semenova A.B., Kazachkov E.L., Dolgushin I.I., Vagenin A.V.

Inflammatory cell infiltrates in around cancer area and tumor zone invasive cancers of breast in association with poor prognosis (HER2 + and triple negative types)

Резюме

Изучен клеточный инфильтрат в опухоли молочной железы и пара-канкротической зоне. Плотность клеточного инфильтрата в зависимости от нарастания уровня пролиферативной активности увеличивается как в параканкротической зоне, так и в зонах сплошного роста опухоли, причем в зонах сплошного роста опухоли преимущественно за счет CD79-позитивных В- лимфоцитов и плазматических клеток. В Her2 позитивных карциномах в воспалительно-клеточном инфильтрате преобладают CD4-позитивные Т-лимфоциты над CD8-позитивными, их соотношение в пролиферате составляет 1,6:1,0 (в норме 4:1). В более тяжелых по прогнозу тройных негативных карциномах это соотношение приближается к 1:1 за счет прироста численности как CD4-позитивных лимфоцитов, так и более CD8-клеток с тенденцией к преобладающей локализации элементов инфильтрата в параканкротической зоне.

Ключевые слова: канцерогенез, карцинома молочной железы, «микроокружение» опухоли

Summary

According to literature, differentiation degree, histological type and expressiveness of a lymphoid infiltration of a stroma of a tumor of a grade of a new growth which, along with such clinic-anatomic factors as localization and a stage of process, define results of treatment and the forecast of a disease. Density of cellular infiltrate depending on increase of level of proliferative activity increases both in a in the zone round of a tumor, and in zones of continuous growth of a tumor, and in zones of continuous growth of a tumor mainly at the expense of CD79 positive In lymphocytes and plasmatic cages. By us it is established that in Her2 positive carcinomas nevertheless in inflammatory and cellular infiltrate CD4 positive T lymphocytes over CD8 positive prevail, but their ratio in a Ki67 1,6 : 1,0 (in norm 4:1), and in heavier according to the forecast threefold negative carcinomas comes nearer to 1:1, at the expense of a number gain as CD4 of positive lymphocytes and more expressed CD8 of positive lymphocytes with a tendency of the prevailing localization of elements of infiltrate in the zone round of a tumor .

Key words: carcinogenesis, carcinoma of the breast, microenvironment of tumor

Введение

Тройной негативный рак молочной железы не экспрессирует рецепторов эстрогенов, прогестерона и амплифицированный ген Her-2/neu. Эта группа новообразований молочной железы гестерогенна, составляет от 25 до 39% всей группы карцином молочной железы [1]. Она представлена самыми разнообразными гистологическими вариантами новообразований преимущественно низкой степени дифференцировки [2].

HER2/neu позитивный рак молочной железы встречается в 8-15% случаев. При иммуногистохимическом исследовании определяется негативная экспрессия рецепторов к половым гормонам, позитивная экспрессия HER2/neu, высокий пролиферативный индекс опухолевых клеток (экспрессия Ki67 более 20%) [3]. Клинически для таких карцином характерен большой размер опухолевого узла, частое вовлечение в метастатический процесс лимфатических узлов, низкие показатели общей выживаемости.

Ранее нами показано [4-6], что степень дифференцировки, гистологический тип, характер и выраженность лимфоплазмозитарной инфильтрации стромы карциномы молочной железы являются объективными критериями злокачественности новообразования, которые, наряду с такими клинико-анатомическими факторами, как локализация и стадия процесса, определяют результаты лечения и прогноз заболевания. При этом отмечено [7-9], что в злокачественных опухолях молочной железы субпопуляции цитотоксических/супрессорных CD8+ клеток преобладают над хелперами/индукторами CD4+, а высокий уровень представительства T-лимфоцитов в демаркационном инфильтрате положительно влияет на прогноз заболевания.

Другие исследователи [10,11] установили отрицательную корреляционную связь между количеством CD4+-клеток и некоторыми характеристиками карциномы молочной железы, такими как клеточный полиморфизм и число пораженных опухолью лимфоузлов. При изучении клеточного состава воспалительного инфильтрата было установлено, что снижение показателя T-клеточного компонента в демаркационной инфильтрации опухоли имеет связь с регионарным метастазированием, а размер опухоли не зависит от степени выраженности ее лимфоцитарной инфильтрации [12,13].

Таким образом, данные о структурных особенностях воспалительно-клеточного инфильтрата в карциномах молочной железы и их связи со степенью злокачественности опухоли, представляются противоречивыми, а вопрос о характере участия элементов параканкрозной зоны в течении и прогрессии опухолевого процесса ещё далёк от разрешения.

Цель настоящего исследования – оценить образование сетей ДНК аутологичными нейтрофилами микроокружения HER2 позитивных нелюминальных и тройных негативных инвазивных карцином молочной железы с фенотипированием элементов клеточного состава микроокружения в интрадукторальной и параканкрозных зонах опухоли.

Материалы и методы

Исследован операционный материал от 227 пациенток после радикальной мастэктомии по Маддену либо Пэйти с верифицированной ранее карциномой молочной железы. В ходе исследования трепан-биоптатов опухоли, полученных перед операцией, установлено, что это были карциномы, развившиеся из терминальной дольково-протоковой структурной единицы органа, а именно – инвазивные карциномы молочных желез неспецифического типа.

У 106 пациенток, вошедших в 1-ю группу исследования, была верифицирована инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, умеренной степени злокачественности (G2), HER2 позитивный тип нелюминальный. Из них у 68 (64,2%) пациенток зарегистрированы от 2 до 12 метастазов в регионарные лимфоузлы при отсутствии отдаленных метастазов, у 38 (35,8%) больных ни регионарных, ни отдаленных метастазов обнаружено не было.

У 121 пациентки (2-я группа) верифицирована инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, высокой степени злокачественности (G3), тройной негативный тип. У всех женщин этой группы обнаружены метастазы в регионарные лимфоузлы в различном количестве, однако отдаленные метастазы не выявлены.

Степень злокачественности опухоли определялась по общепринятой Ноттингемской системе. Оценка производилась полуколичественным методом в баллах с учётом критериев формирования тубулярных структур, ядерного полиморфизма и митотической активности. При суммарном количестве баллов, равном 3-5, степень злокачественности определялась как низкая, при 6-7 баллах – как умеренная, при 8-9 баллах – как высокая.

При вырезке операционного материала иссекали периферический фрагмент опухоли с окружающей тканью размерами 0,5см×0,5см×0,2см, а также подобный фрагмент из молочной железы на удалении от опухоли, неизменённый макроскопически. После морфометрии карциномы изготавливали мазки на предметных стеклах и окрашивались их по Романовскому-Гимзе. Затем в ходе световой микроскопии дифференцировали формы лейкоцитов и внеклеточной ДНК. Подсчет вели на 100 структур (нейрофильные гранулоциты; свободнолежащие сети ДНК; сети ДНК в непосредственном контакте с опухолевыми клетками).

Обзорное микроскопическое исследование материала выполняли при окраске гематоксилином и эозином. Иммунофенотипирование опухоли для идентификации молекулярно-генетического профиля карциномы опухоли (нелюминальный HER2 позитивный тип, тройной негативный тип) осуществляли с помощью моноклональных антител (МКАТ) к estrogen receptor (Clone 1D 5), progesterone receptor (Clone PgR 636), HER 2 Герцеп-тест, Ki-67 (Clone MIB-1) (Dako, Denmark).

Для иммунофенотипирования клеток воспалительно-клеточного вала, инфильтрирующих зону опухоли, параканкрозную и дистантную зону использованы МКАТ к CD4 (clone 4B12), CD7 (clone CBS.37), CD8 (clone C8/144B), CD56 (clone 123C3), CD 79α (JCB117), CD20 (clone L26) (Dako, Denmark). Иммуногистохимическое исследование проведено на Autostainer Plus (Dako, Denmark) с использованием Target Retrieval Solution в PTLINK (Dako, Denmark) при условиях 97°C (20 мин.)

Особенности воспалительно-клеточной инфильтрации оценивались с использованием микроскопа Leica и учетом 10 полей зрения перитуморозного инфильтрата при увеличении микроскопа ок.10хоб.40 с перерасчётом на 300 клеток инфильтрата с последующим микрофотографированием наиболее типичных изменений.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи статистического пакета Statistica 6.0, программы Microsoft Office Excel. Для обнаружения различий в количественных переменных использовался t-критерий Стьюдента. Достоверность различий выявляли при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При сравнительном анализе полученных результатов в зависимости от возрастания пролиферативной активности опухоли мы наблюдали увеличение плотности воспалительно-клеточного инфильтрата (рис. 1 *этой и другие рисунки к статье см. на специальной цветной вкладке журнала – прим. ред.*), численности в его составе юных и сегментоядерных форм нейтрофильных гранулоцитов (рис. 2) и количества формируемых ими внеклеточных сетей ДНК (рис. 3).

Получены достоверные данные о том, что количество интрагуморальных лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль в зонах сплошного опухолевого роста (рис. 2), было прямо пропорционально связано с общим уровнем лимфоидной инфильтрации опухоли. При нарастании индекса Ki67 опухолевых клеток увеличивалась численность субпопуляции хелперов/индукторов CD4-позитивных клеток и цитотоксических/супрессорных CD8-позитивных лимфоцитов, которые накапливаясь в большей степени в зонах опухолевого роста («горячих» точках) на периферии новообразования. В зонах сплошного опухолевого роста численность этих клеток, напротив, значительно снижалась. Субпопуляции цитотоксических/супрессорных CD8-позитивных лимфоцитов в умеренно и низко-злокачественных карциномах молочной железы в зонах сплошного опухолевого роста приближались по численности к хелперам/индукторам CD4-позитивными клетками, причём в некоторых участках превалируя над ними (рис. 4).

При увеличении индекса Ki67 в клеточных элементах опухоли отмечено понижение уровня естественных киллеров (NK-клеток, CD56-позитивных), причём как в интрагуморальной, так и в параканкротной зонах. Следует отметить, что наименьшее количество NK-клеток было обнаружено у женщин с метастазами в регионарных лимфатических узлах.

При исследовании инфильтрации анализируемых зон CD20-позитивными В-лимфоцитами оказалось, что их количество увеличивалось при повышении степени злокачественности опухоли, хотя мы полагаем, что это также могло быть связано с предсуществующими хроническими воспалительными процессами в молочных железах (рис.5).

При исследовании сосудов микроциркуляторного русла параканкротной и интрагуморальной зон особенностью распределение артериол, капилляров и венул явилось их преимущественное расположение на границе с опухолью или в непосредственной близости от новообразования. Причём для HER2 позитивной карциномы молочной железы характерным было обнаружение множества мелких сосудистых сетей из артериол и капилляров, в то время как при опухольях с тройным негативным типом зачастую обнаруживали петлистую широкопросветную густую сеть полнокровных артериол и венул.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного анализа материала не было отмечено закономерных связей

между характером и выраженностью лимфоидной инфильтрации различных зон опухоли, с одной стороны, и размером карциномы – с другой. При увеличении уровня пролиферативной активности клеток опухоли плотность клеточного инфильтрата также нарастает, причём и в параканкротной зоне, и в зонах сплошного роста опухоли, причём в последней локализации – преимущественно за счет CD79-позитивных В-лимфоцитов и плазматических клеток, а в «горячих» точках опухолевого роста и в параканкротной зоне – за счет всех компонентов воспалительно-клеточного инфильтрата.

В Her2-позитивных карциномах в воспалительно-клеточном инфильтрате CD4-позитивные Т-лимфоциты хоть и преобладают (их соотношение с CD8-позитивными клетками в инфильтрате составляет 1,6:1,0 против нормального соотношения 4:1), но в более неблагоприятных в отношении прогноза тройных негативных карциномах это соотношение приближается к 1:1 за счет прироста численности как CD4-позитивных лимфоцитов, так и CD8-позитивных клеток (в большей степени) с преобладающей локализацией элементов инфильтрата в параканкротной зоне.

Количество NK-клеток в зоне инфильтрата с повышением уровня Ki67 в клетках опухоли уменьшалось, особенно в наблюдениях 2-й группы, когда в поле зрения удавалось встретить единичные NK-клетки.

HER2 позитивные карциномы молочной железы характеризовались наличием множества мелких сосудистых сетей как в зонах сплошного опухолевого роста, так в «горячих» зонах роста опухоли, а карциномы молочной железы с тройным негативным типом отличались полями более петлистых широкопросветных густых сетей сосудов артериолярного и венулярного типов. ■

Семенова А.Б., к.м.н., зав. лабораторно-диагностической службой ГБУЗ «ЧОКОД», г. Челябинск; Казачков Е.Л., д.м.н., профессор, зав. каф. патологической анатомии и судебной медицины ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Далзушин И.И., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Важенкин А.В. член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой онкологии, лучевой диагностики и лучевой терапии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку - Семёнова Анна Борисовна, к.м.н., зав. лабораторно-диагностической службой ГБУЗ «ЧОКОД», г. Челябинск. Адрес для переписки: 454082, г.Челябинск, ул. Блюхера 42, тел. (351)232-78-55, e-mail: asemenova81@mail.ru.

Литература:

1. Франк Г.А., Данилова Н.В., Андреева Ю.Ю., Нефедова Н.А. Классификация опухолей молочной железы ВОЗ 2012 года. *Архив патологии.* 2013; 2: 53-63.
2. Карселадзе Д.А., Поддубная И.В., Карселадзе Д.А. Морфология тройного негативного рака молочной железы. *Архив патологии.* 2010; 2: 8-12.
3. Завьялова М.В., Вторушин С. В., Перельмутер В.М., Слономская Е.М., Савенкова О.В., Гарбуков Е.Ю. Зависимость лимфогенного метастазирования морфологического строения первичного опухолевого узла при уницентричном инфильтрирующем протоковом раке молочной железы у больных с разным состоянием менструальной функции. *Сибирский онкологический журнал* 2008; 3: 5-9.
4. Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Кузнецова А.Б., Казачков Е.Л., Шаманова А.Ю., Чиркова Г.Г. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети ДНК сдерживают рост опухолевых клеток. *Российский иммунологический журнал.* 2013; 7(2-3): 130.
5. Dolgushin I.I., Shishkova Y.S., Kuznetsova A.B., Kazachkov E.L., Shamanova A.U., Chirkova G.G. Neutrophil extracellular DNA networks restrain growth of tumor cells. *Internationaler Medizinischer Kongress «Moderne Aspekte der Prophylaxe, behandlung und rehabilitation. Euromedica Hannover.* 2013: 62-63.
6. Казачков, Е.Л. Шаманова А.Ю., Семенова А.Б. Особенности лимфоцитарного состава микроокружения опухоли при местнораспространенном плоскоклеточном раке гортани различных степеней дифференцировки. *Челябинск: Издательство ЮУТМУ.* 2014: 33-35.
7. Долгушин И.И., Семенова А.Б., Шишкова Ю.С., Казачков Е.Л., Шаманова А.Ю., Важенин А.В. Функциональная активность нейтрофилов и процессы формирования ими сетей внеклеточной ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы молочной железы. *Медицинский вестник Башкортостана.* 2014; 9(5): 132-135.
8. Коган И.Ю. Белоусова О.Н., Асеева И.В. Оценка васкуляризации молочных желез при различных формах мастопатии. *Бюллетень Сибирской медицины.* 2005; 4(приложение1): 175.
9. Aruga A., Aruga E., Tanigawa K., Bishop D.K., Sondak V.K., Chang A.E. Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. *J. Immunol.* 1997; 159: 664-673.
10. Balch C. Patterns of human tumor infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch. Surg.* 1990; 125□2□: 200-205.
11. Коган И.Ю., Максимова М.О. Васкуляризация паренхимы молочных желез у женщин с фиброзно-кистозной болезнью. *Журнал акушерства и жен. болезней.* 2007; (VI), спец. вып.: 159.
12. Золотова Е.Н., Доросевич А.Е. Современные аспекты морфогенеза рака молочной железы. *Архив патологии.* 2004; 1: 51-55.
13. Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abu Abed U, et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Frontiers in immunology.* 2013; 4: 48-54.

Семенова А.Б., Казачков Е.Л., Долгушин И.И., Важенин А.В.

Воспалительно-клеточный инфильтрат в опухоли и параканкротозной зоне при инвазивных карциномах молочной железы с неблагоприятным клиническим прогнозом (HER2-позитивный и тройной негативный типы новообразования)

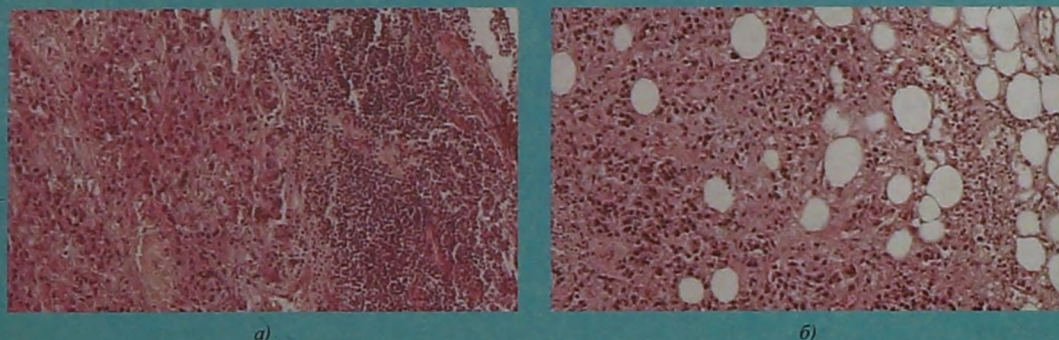


Рис.1. Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа. А) Ki67 75%; Б) Ki67 45%. Окраска – гематоксилином и эозином; ок.10 х об.20.

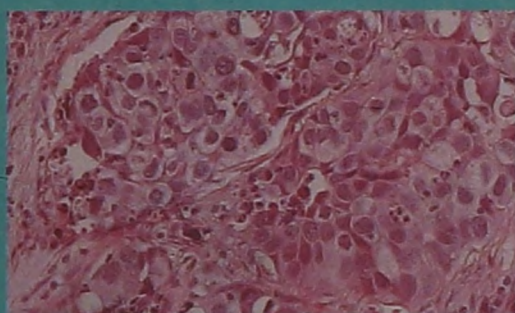


Рис.2. Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа с интратуморальной гранулоцитарной инфильтрацией. Окраска – гематоксилином и эозином; ок.10 х об.40.

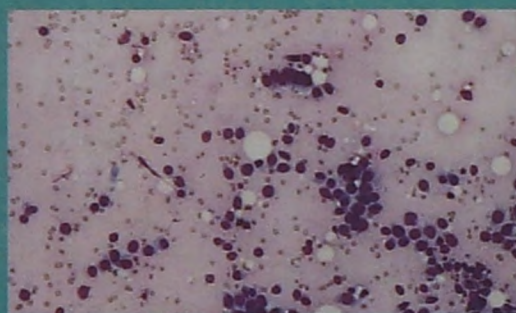


Рис. 3. Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа высокой степени злокачественности, тройной негативный тип (Ki67 80%). Окраска по Романовскому-Гимзе; ок.10 х об.40.

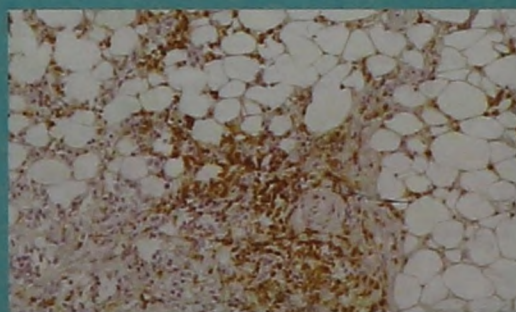
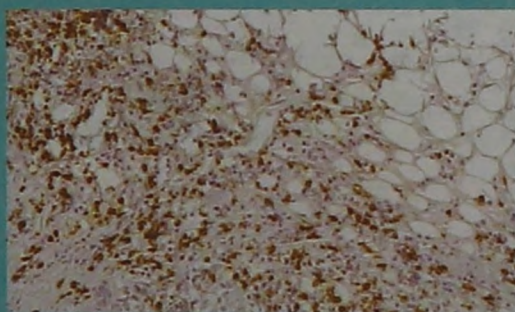


Рис. 4. Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа. А) CD4-позитивные клетки; Б) CD8-позитивные клетки. Окраска – иммуногистохимический метод: А) МКАТ против CD4 (clone 4B12); Б) МКАТ против CD8 (clone C8/144B); ок.10 х об.20.



Рис.5. Распределение элементов воспалительно-клеточного инфильтрата в интраопухолевой зоне инвазивных карцином молочной железы различных молекулярно-генетических типов

Семенова А.Б., Казачков Е.Л., Долгушин И.И., Важеннин А.В.

Формирование нейтрофильными гранулоцитами сетей внеклеточной ДНК как дополнительный диагностический критерий степени злокачественности карцином молочной железы



Рис. 1. Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа высокой степени злокачественности, тройной негативный тип (Ki67 80%) (суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови). Окраска по Романовскому-Гимзе; ок.10 х об. 40.



Рис.2. Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа высокой степени злокачественности, тройной негативный тип (Ki67 80%) с образованием нейтрофильных внеклеточных сетей ДНК (суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови). Окраска – антитела к миелопероксидазе; ок.10 х об.40.

Дуб А. А., Юсупова И. Р.

Роль муцинов и панцитокератинов AE1/AE3 и D2-40 в дифференциальной диагностике атипичной мелкоацинарной пролиферации и аденокарциномы предстательной железы высокой и низкой степени дифференцировки

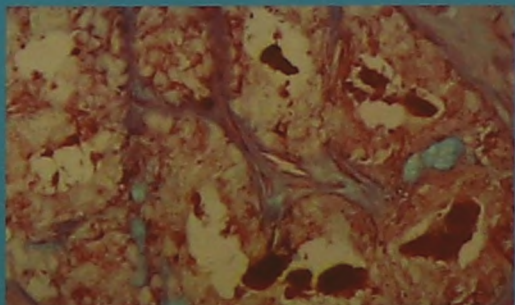


Рис. 1. Муцинообразование в железистом эпителии при доброкачественной эпителиальной гиперплазии предстательной железы. Цитоплазма железистого эпителия содержит гранулы красного-фиолетового цвета, в просвете желез просматривается содержимое голубого цвета. Окраска ШИК-реакция и альциановый синий. × 400

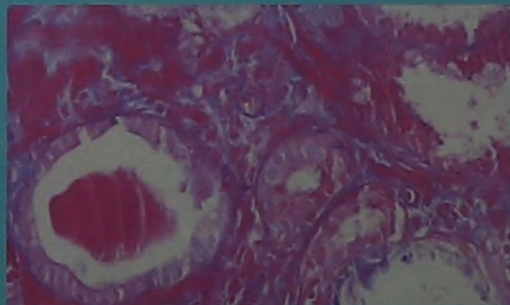


Рис. 2. Муцинообразование при аденокарциноме предстательной железы высокой степени дифференцировки. Цитоплазма атипичных эпителиоцитов содержит гранулы малиново-голубого цвета, наличие в просвете желез секрета красно-фиолетового оттенка. Окраска ШИК-реакция и альциановый синий. × 400