

Казачков Е.Л.¹, Семенова А.Б.^{1,2}, Шаманова А.Ю.^{1,2}

Структурные особенности воспалительно-клеточного инфильтрата в параканкрозной и дистантной зонах инвазивных карцином неспецифического типа молочной железы различных степеней злокачественности

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

Kazachkov E.L., Semenova A.B., Shamanova A.Y.

Structural features of inflammatory cell infiltrates in around cancer area and distant zone invasive cancers nonspecific type breast in association with tumor grade

Резюме

Микроокружение опухоли является важным компонентом опухолевой прогрессии. Рак молочной железы сегодня является самой распространенной злокачественной опухолью у женщин. Целью исследования явилось: детализировать клеточный состав микроокружения в интра tumorальной, параканкрозной и дистантной зонах инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа в зависимости от степени злокачественности. В наших исследованиях не было замечено определенной связи между выраженностью и разнородностью лимфоидной инфильтрации различных зон опухоли в зависимости от ее размеров. Нами установлена зависимость между интенсивностью (характером) изменений в параканкрозной зоне и степенью злокачественности карцином молочной железы

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

Summary

Tumor microenvironment is an important component of tumor progression. Breast cancer is currently the most common malignancy in women. The aim of the study was to: detail the cellular composition of the microenvironment in intratumoral, parakankroznoy and distant areas of invasive breast carcinomas non-specific type depending on the degree of malignancy. In our studies was not seen definite connection between the expression and the heterogeneity of lymphoid infiltration of the tumor in different zones depending on its size. We have established a relationship between intensity (character) changes in around cancer area and degree of malignancy of breast carcinomas

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

Введение

Микроокружение опухоли является важным компонентом опухолевой прогрессии. Оно представлено внеклеточным матриксом, нервными окончаниями, кровеносными сосудами, фибробластами, а также клетками воспалительного инфильтрата. Клетки инфильтрата, продуцируя сигнальные молекулы типа провоспалительных цитокинов, селектинов, хемокинов, которые могут воспринимать опухолевые клетки, определяют пролиферативную активность, миграцию и метастазирование опухолевых клеток [1,2,3,4,5]. Несмотря на это, углубленное изучение роли и значения противоопухолевой защиты в возникновении и развитии рака занимает одно из ведущих направлений в современной иммунологии,

наряду с иммунодиагностикой и иммунотерапией [6]. Постоянство эпителиально-стромальных взаимоотношений, как важнейшая биологическая особенность раковой прогрессии, определяет особую теоретическую и прикладную значимость комплексной морфологической оценки паренхимы и стромы опухоли [7,8].

Рак молочной железы сегодня является самой распространенной злокачественной опухолью у женщин. Наиболее часто мы наблюдаем эпителиальные новообразования молочных желез, и все они на сегодняшний день разделены на несколько групп: микроинвазивная карцинома, инвазивная карцинома, эпителиально-мезоэпителиальные поражения, предраковые изменения, внутрипротоковые пролиферативные поражения, папил-

лярные поражения. доброкачественная пролиферация члителя [9].

По данным литературы [10], степень дифференцировки, гистологический тип и выраженность лимфоплазмочитарной инфильтрации стромы опухоли являются объективными критериями злокачественности новообразования, которые, наряду с такими клинико-анатомическими факторами, как локализация и стадия процесса, определяют результаты лечения и прогноз заболевания. Известно [11], что у онкологических больных рост злокачественных новообразований сопровождается снижением количества естественных киллеров, Т-хелперов и увеличением Т-супрессоров.

Большинство исследователей сходятся в том, что инфильтрация карцином молочной железы Т-лимфоцитами положительно влияет на прогноз. Показано преобладание в злокачественных опухолях молочной железы субпопуляции цитотоксических/супрессорных CD8+ клеток над хелперами/индукторами CD4+ [12]. В то же время получены противоположные результаты; кроме того, они установили отрицательную корреляционную связь между количеством CD4+ клеток и некоторыми показателями: размером опухоли, клеточным полиморфизмом и числом пораженных лимфоузлов [13]. При изучении клеточного состава воспалительного инфильтрата было установлено, что снижение уровня Т-клеточной инфильтрации опухоли имеет связь с регионарным метастазированием или наличием микрометастазов, а размер опухоли не взаимосвязан с уровнем ее лимфоцитарной инфильтрации. Было доказано, что увеличение количества интрамуральных Т-киллеров является фактором благоприятного прогноза у больных раком молочной железы, преимущественно без регионарного метастазирования [14].

Таким образом, структурные особенности воспалительно-клеточного инфильтрата в карциномах молочной железы и их связь со степенью злокачественности опухоли, остаются противоречивыми, а вопрос о возможном участии в течении и прогрессии опухолевого процесса, открытым.

Целью исследования явилось: детализировать клеточный состав микроокружения в интрамуральной, параканкротической и дистантной зонах инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа в зависимости от степени злокачественности.

Материалы и методы

Для исследования был взят послеоперационный материал 70 пациенток с верифицированной ранее по результатам трепанобиопсии опухоли после радикальной мастэктомии по Маддену или Пэйти. Для исследования были взяты карциномы молочной железы, развивающиеся из терминальной дольково-протоковой структурной единицы - инвазивные карциномы неспецифического типа.

У 25 пациенток была верифицирована инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, низкой степени злокачественности (G1) и не было ме-

тастозов в регионарных лимфоузлах, у 24 пациенток инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, умеренной степени злокачественности (G2), у восьми пациенток не было метастазов в регионарных лимфоузлах и отдаленных метастазов, в шестнадцати пациенток были от 2 до 6 метастазов в регионарные лимфоузлы и не было обнаружено отдаленных метастазов, у 21 пациенток инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, высокой степени злокачественности (G3), у всех пациенток были в различном количестве метастазы в регионарные лимфоузлы, и не было обнаружено отдаленных метастазов.

Степень злокачественности опухоли определялась по общепринятой Ноттингемской системе. Оценка производилась полуквантитативным методом в баллах. Оценивались следующие параметры: формирование тубулярной структуры, ядерный полиморфизм, митотическая активность. Если тубулярная структура преобладала (более 75%) - 1 балл; умеренное количество тубулярных структур (10-75%) - 2 балла; тубулярных структур мало или они отсутствуют (менее 10%). Если в опухоли преобладали мелкие однообразные клеточки - 1 балл, при умеренном увеличении размера и вариабельности - 2 балла, при выраженной изменчивости - 3 балла. Количество митозов в 10 полях зрения при увеличении 400: от 0-7 в полях зрения - 1 балл; от 8-14 - 2 балла; более 15 - 3 балла. Низкая степень злокачественности определялась при количестве баллов 3-5, умеренная - 6-7 баллов, высокая - 8-9 баллов.

Молочная железа рассекалась в проекции опухоли, и забирался фрагмент с периферии узлов образования с окружающей тканью 0,5см×0,5см×0,2см. Также забирался аналогичного размера фрагмент из неизменной ткани молочной железы на удалении от опухоли. Оценивался размер опухоли в наибольшем протяжении.

Обзорная микроскопия проводилась в окраске гематоксилином и эозином. Иммунофенотипирование клеток воспалительно-клеточного инфильтрата, инфильтрирующей зоны опухоли, параканкротическую зону и клеточный состав стромы дистантной зоны, осуществлялось с помощью MKAT (Dako, Дания) к CD4 (clone 4B12), CD7 (clone CBS.37), CD8 (clone C8/144B), CD56 (clone 123C3), CD20 (clone L26). Иммуногистохимическое исследование проведено на AutostainerPlus (Dako). Обработка материала выполнена с использованием TargetRetrieval Solution в PTLINK (Dako) при условиях 97°C, 20 мин.

Особенности воспалительно-клеточной инфильтрации оценивались нами с использованием микроскопа Leica с учетом нескольких полей зрения перитуморозного инфильтрата при увеличении микроскопа 10x40 с подсчетом на 300 клеток инфильтрата.

Осуществляли микрофотографирование. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи статистического пакета Statistica6.0, программы MicrosoftOfficeExcel. Для обнаружения различий в количественных переменных использовался t-критерий Стьюдента. Достоверность различий выявляли при p<0,05.

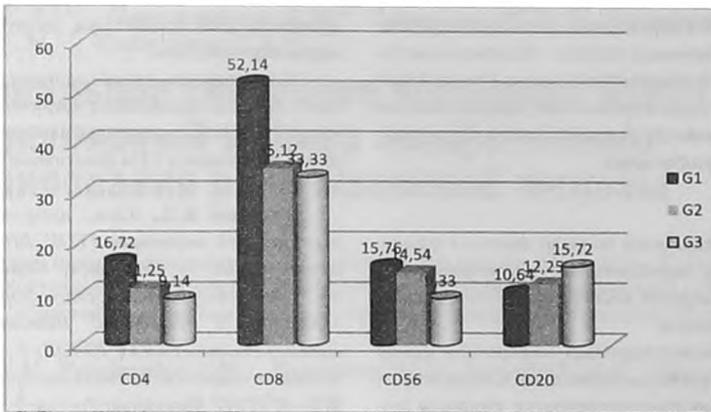


Рис. 1. Распределение воспалительно-клеточного инфильтрата в интратуморальной зоне инвазивных карцином молочной железы в зависимости от степени злокачественности (G).

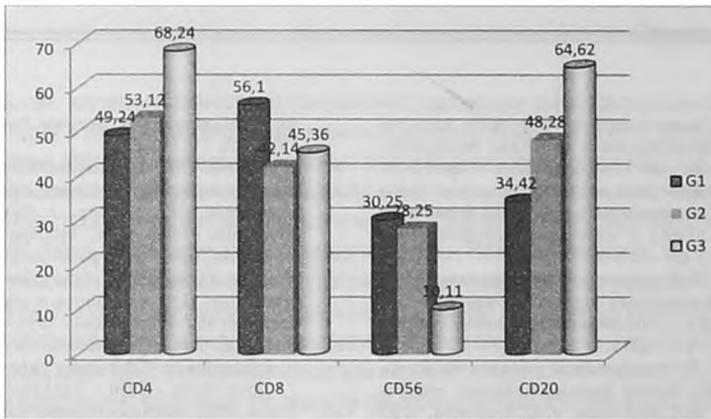


Рис. 2. Распределение воспалительно-клеточного инфильтрата в параканкротической зоне инвазивных карцином молочной железы в зависимости от степени злокачественности (G).

Результаты и обсуждение

При анализе полученных данных, обращало на себя внимание, что количество лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль в зонах сплошного опухолевого роста (интратуморальных), достоверно прямо пропорционально связано с общим уровнем лимфоидной инфильтрации опухоли. Причем, субпопуляции цитотоксических/супрессорных CD8 позитивных лимфоцитов преобладали в зонах сплошного опухолевого роста над хелперами/индукторами CD4 - позитивными клетками. И в зависимости от возрастания степени злокачественности опухолей мы наблюдали подавление их активности и в интратуморальной и в параканкротической зонах опухолей (рис. 1,2).

Напротив, в зависимости от нарастания степени злокачественности опухолей, увеличивалась численность субпопуляции хелперов/индукторов CD4 - позитивных клеток, в большей степени накапливаясь в параканкротической зоне опухоли. А в зонах сплошного опухолевого роста их численность незначительно снижалась.

Было выявлено, что у больных с увеличением степени злокачественности снижалось количество естественных киллеров (NK-клеток, CD56- позитивных), как в интратуморальной, так и в параканкротической зонах (рис. 1,2). Причем наиболее выраженное пропорциональное уменьшение количества клеток было замечено в параканкротической зоне. Обращает на себя внимание, что наименьшее количество NK- клеток было обнаружено у женщин с метастазами в регионарные лимфатические узлы. И незначительные изменения данного показателя мы наблюдали в дистантных зонах молочных желез.

При исследовании инфильтрации зон CD20 позитивными В - лимфоцитами, количество увеличивалось в различной степени выраженности в зависимости от роста степени злокачественности опухоли, и вероятно так же могло быть связано с предшествующими хроническими воспалительными процессами в молочных железах. В параканкротической зоне в полиморфноклеточном окружении преобладали В-лимфоциты (CD20-позитивные),

иногда с тенденцией к образованию фолликулоподобных структур без герминативных центров. Плотность клеточного инфильтрата в карциномах в непосредственной близости к опухолевой ткани определялась нами как высокая и прямо пропорционально уменьшалась по ходу удаления от опухолевых разрастаний.

Заключение

В наших исследованиях не было замечено определенной связи между выраженностью и разнородностью лимфоидной инфильтрации различных зон опухоли в зависимости от ее размеров.

Нами установлена следующая зависимость между интенсивностью (характером) изменений в параканкротической зоне и степенью злокачественности карцином молочной железы: чем выше степень злокачественности, тем слабее выраженность диффузно-очаговой лимфоцитарной инфильтрации цитотоксическими CD8 – позитивными лимфоцитами и НК клетками, с тенденцией

преобладающей локализации элементов инфильтрата в параканкротической зоне.

С изменением степени злокачественности карциномы от G1 к G3 определяется увеличение клеточной плотности В лимфоцитарного инфильтрата в параканкротической зоне с накоплением CD4 позитивных Т хелперов в ней. ■

Казачков Е.Л., д.м.н., профессор, зав. каф. патологической анатомии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Семенова А.Б., к.м.н., зав. лабораторно-диагностической службой ГБУЗ «ЧОКОД», г. Челябинск; Шаманова А.Ю., врач-патологоанатом ГБУЗ «ЧОКОД» г. Челябинск, заочный аспирант кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку: Шаманова Анна Юрьевна, врач-патологоанатом ГБУЗ «ЧОКОД», адрес для переписки: 454082, г. Челябинск, ул. Блюхера 42, тел. (351)232-78-55, e-mail: anna-sha@bk.ru.

Литература:

1. Завьялова М.В. Зависимость лимфогенного метастазирования морфологического строения первичного опухолевого узла при уницентричном инфильтрирующем протоковом раке молочной железы у больных с разным состоянием менструальной функции / М.В. Завьялова [и др.] // сибирский онкологический журнал. - 2008. - ч3. - С. 5-9.
2. Долгушин И.И. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети ДНК сдерживают рост опухолевых клеток / И.И. Долгушин [и др.] // Российский иммунологический журнал. - 2013. - Т. 7, ч2-3. - С.130.
3. Долгушин И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева, А.Ю. Савочкина - М.: Издательство РАМН. 2009. - 208 с.
4. Dolgushin I.I. Neutrophil extracellular DNA networks restrain growth of tumor cells, Internationaler Medizinischer Kongress «Moderne Aspekte der Prophylaxe, behandlung und rehabilitation» / I.I. Dolgushin [et al.] // Euromedica Hannover. - 2013. - P.62-63.
5. Казачков, Е.Л. Особенности лимфоцитарного состава микроокружения опухоли при местнораспространенном плоскоклеточном раке гортани различных степеней дифференцировки / Е.Л. Казачков, А.Ю. Шаманова, А.Б. Семенова. — Челябинск: Издательство ЮУГМУ, 2014. — с. 33-35.
6. Долгушин И.И. Функциональная активность нейтрофилов и процессы формирования ими сетей внеклеточной ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы молочной железы / И.И. Долгушин [и др.] // Медицинский Вестник Башкортостана. - 2014. - Т. 9, ч5. - С.132-135.
7. Коган И.Ю. Оценка васкуляризации молочных желез при различных формах мастопатии / И.Ю. Коган, О.Н. Белоусова, И.В. Асеева // Бюллетень Сибирской медицины - 2005. - Т.4, прилож.1. - С. 175.
8. Aruga A. Type 1 vs type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role / A. Aruga et al. // J.Immunol. - 1997. - Vol.159. - P.664-673.
9. Balch C. Patterns of human tumor infiltrating lymphocytes in 120 human cancers / C. Balch et al. // Arch. Surg. - 1990. - Vol.125ч2ц. - P.200-205.
10. Коган И.Ю. Васкуляризация паренхимы молочных желез у женщин с фиброзно-кистозной болезнью / И.Ю. Коган, М.О. Максимова // Ж. акуш. и жен. болезни. - 2007. - Т.LVI, спец. вып. - С. 159
11. Золотова Е.Н. Совершенные аспекты морфогенеза рака молочной железы / Е.Н. Золотова, А.Е. Дорошевич // Архив патологии. - 2004. - ч1. - С. 51-55.
12. 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.
13. Berger-Achituv S. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoeediting / S. Berger-Achituv, [et al.] // Frontiers in immunology. - 2013. - Vol.4. - P. 48.
14. Brinkmann V. Neutrophil extracellulartraps kill bacteria / V. Brinkmann [et al.]// Science. - 2004. - Vol. 303. - P. 1532-1535.