

Шаманова А.Ю., Казачков Е.Л., Семенова А.Б.

Сосуды и лимфоцитарный инфильтрат как компоненты микроокружения опухоли при местнораспространенном раке гортани

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

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

Vessels and lymphocytic infiltrate as components of the microenvironment of tumor with locally advanced laryngeal cancer

Резюме

В статье приводятся результаты патоморфологического исследования сосудистого и лимфоцитарного компонентов параканкротической зоны местнораспространенного рака гортани высокой степени дифференцировки различных клинических стадий. Изучены качественно-количественные характеристики лимфоцитарного воспалительного инфильтрата и микроциркуляторного русла, проведена оценка связи компонентов микроокружения опухоли с ее клинической стадией. Высказано предположение о влиянии опухолей поздних клинических стадий на активную ответную реакцию компонентов микроокружения.

Ключевые слова: рак гортани, лимфоциты, сосуды, параканкротическая зона, микроокружение опухоли

Summary

These objective criteria of malignancy of tumors as the degree of differentiation of the tumor, histological type and severity of lymphoplasmacytic infiltration stroma, along with clinical and anatomical factors (localization and stage of the process), determine the results of the treatment and prognosis of the disease. Strict consistency epithelial-stromal relationship as the most important biological feature of cancer progression, defines special theoretical and applied importance of a comprehensive morphological evaluation of parenchyma and stromal tumor. Along with this, the area around the tumor, acting as a direct microenvironment of tumor with qualitative and quantitative features of the components, remains poorly known, and the question of possible participation in the course and progression of the tumor process, remains open.

Key words: cancer of the larynx, lymphocytes, vessels, area around the tumor, the tumor microenvironment

Введение

Известны механизмы противоопухолевой резистентности, клеточные и гуморальные факторы защиты [1]. На сегодняшний день имеется достаточно большое количество научных работ, посвященных изучению взаимодействия организма и опухоли, которая растет вопреки имеющемуся иммунному ответу на неё. 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, иммунопрофилактикой и иммунотерапией [2]. Строгое постоянство эпителиально-стромальных взаимоотношений, как важнейшая биологическая особенность раковой прогрессии, определяет особую теоретическую и прикладную значимость комплексной морфологической оценки паренхимы и стромы опухоли [3,4]. Наряду с этим, параканкротическая зона, выступая как непосредственное микроокружение опухоли с качественно-количественными

особенностями компонентов, остается малоизученной, а вопрос о возможном участии в течении и прогрессии опухолевого процесса, остается открытым. Особое значение сегодня придает исследованию системы гемомикроциркуляции и процессов ангиогенеза в новообразовании, равно как и изучению выраженности и качественного состава воспалительной инфильтрации в зоне демаркации [5]. Известно [6], что у онкологических больных рост злокачественных новообразований сопровождается снижением количества естественных киллеров, Т-хелперов и увеличением Т-супрессоров.

Ранее нами установлено, что в зависимости от степени дифференцировки опухоли её микроокружение при местнораспространенных плоскоклеточных карциномах гортани (T1-3N0M0) разнообразно по составу и клеточной плотности [7]. Необходимость детализации микроокружения РГ и выявления качественно-количественных характеристик лимфоцитарного компонента параканкротической зоны с оценкой плотности распределения микро-

Таблица 1. Результаты морфометрического исследования CD4- CD7- CD8- CD56-позитивных лимфоцитов.

	T ₁ N ₀ M ₀ I стадия n=8	T ₂ N ₀ M ₀ II стадия n=9	T ₃ N ₀ M ₀ III стадия n=10
CD4-позитивные лимфоциты	40,4±3,4	43,4±2,6	87,2±3,3
CD7-позитивные лимфоциты	33,3±2,1	35,1±2,7	80,1±2,4
CD8-позитивные лимфоциты	30,2±4,4	60,4±2,8	83,5±2,2
CD56-позитивные лимфоциты	25,7±1,8	28,3±4,2	31,2±2,6

Примечание: n – число пациентов.

□□□ – достоверность различий между группами III и II соответственно, p<0,05.

Подсчет CD4- CD7- CD8- CD56-позитивных лимфоцитов проводился на 300 клеток воспалительного инфильтрата параканкротной зоны в местнораспространенных РГ высокой степени дифференцировки (G1).

циркуляторного русла (МЦР) в местнораспространенных плоскоклеточных карциномах гортани (T1-3N0M0) высокой степени дифференцировки (G1) и явилось целью настоящего исследования.

Материалы и методы

Проведено гистологическое, иммуногистохимическое исследование операционного опухолевого материала, полученного в процессе хирургического лечения (ларингэктомия) без предшествующей лучевой терапии пациентов ГБУЗ «ЧОКОД» за период 2013–2014 гг. Среди больных было 23 мужчин и 4 женщины (всего 27 больных). Средний возраст мужчин составил 54,7±3,4 лет, женщин — 50,7±2,5. Ранее при предоперационном исследовании биопсийного материала у этого контингента больных была верифицирована плоскоклеточная ороговевающая карцинома гортани высокой степени дифференцировки (G1). Обзорная микроскопия проводилась в окраске гематоксилином и эозином, сосуды микроциркуляторного русла (МЦР) параканкротной зоны выявляли иммуногистохимически с помощью моноклональных антител (МКАТ) (Dako, Дания) к CD34 (CloneQVEnd 10). Иммунофенотипирование клеток параканкротного инфильтрата вокруг сосудов осуществлялось с помощью МКАТ (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 TargetRetrievalSolution в PTLINK (Dako) при условиях 97°C, 20 мин. Наблюдения были разделены на три группы в зависимости от клинической стадии опухолевого процесса. Первую группу составили случаи местнораспространенного рака гортани I клинической стадии (T1N0M0) — 8 случаев (30%), во вторую вошли случаи II клинической стадии (T2N0M0) — 9 (33%), в третью случаи III клинической стадии (T3N0M0) — 10 (37%).

Особенности инфильтрации лимфоцитами и сосудистого компонента параканкротной зоны оценивались нами с использованием микроскопа Leica с учетом нескольких полей зрения перитуморозного инфильтрата при увеличении микроскопа 10x40 с подсчетом на 300 клеток

инфильтрата. Микроциркуляторное русло параканкротной зоны (МЦР) при раке гортани (РГ) различных клинических стадий оценивался иммуногистохимическим методом с помощью моноклональных антител к CD34 (CloneQVEnd 10) (рис. 1-6). Осуществляли микрофотографирование. 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 оценке клеточного состава демаркационного воспалительного инфильтрата вокруг опухоли нами установлено, что в параканкротной зоне в полиморфноклеточном окружении преобладали В-лимфоциты (CD20-позитивные), иногда с тенденцией к образованию фолликулоподобных структур без герминативных центров. Плотность клеточного инфильтрата в плоскоклеточных карциномах в непосредственной близости к опухолевой ткани определялась нами как высокая и прямо пропорционально уменьшалась по ходу удаления от опухолевых разрастаний. При иммуногистохимическом исследовании лимфоцитарного компонента параканкротного инфильтрата установлено, что с изменением клинической стадии опухолевого процесса (от I к III клинической стадии) количество CD4- и CD7-позитивных лимфоцитов увеличивалось, причём наблюдалась выраженная диффузно-очаговая инфильтрация этими клетками не только параканкротной зоны, но и стромы самой опухоли. Наряду с этим, клеточная плотность CD8- и CD56-лимфоцитов была выше при III клинической стадии, однако уже без тенденции к распространению T-клеточного инфильтрата в строму новообразования. Вокруг сосудов МЦР параканкротной зоны, иногда с тенденцией к образованию периваскулярных муфт, располагаются цитотоксические T-лимфоциты (CD8-позитивные клетки), естественные киллеры (CD56-позитивные) в большей степени при II и III клинических стадиях (табл. 1). Распределение артериол, капилляров и венул в параканкротной зоне характеризуется преимуще-

ственным расположением их на границе с опухолью, наличием мелких сосудистых сетей на более ранних клинических стадиях опухолевого процесса, и более петлистых широкопросветных густых сетей при III клинической стадии (рис.1-6 - рисунки к статье см. на специальной цветной вставке журнала - прим. ред.). Представленные микрофотографии сделаны при увеличении микроскопа 10x10 с целью наглядно отразить параканкротную и опухолевую зоны.

Заключение

Обнаружена взаимосвязь размера опухоли (клинической стадии) с плотностью МЦР в параканкротной зоне, а также с интенсивностью и плотностью лимфоцитарной инфильтрации. Не найдено достоверных различий в количестве CD4- CD7-позитивных лимфоцитов при I и III клинической стадии РГ высокой степени дифференцировки (G1).

Нами установлена прямая зависимость между интенсивностью (характером) изменений в параканкротной зоне и вариантом клинической стадии РГ: чем менее распространен опухолевый процесс (начальные клинические стадии РГ), тем слабее выраженность диффузно-очаговой лимфоцитарной инфильтрации с тенденцией преобладающей локализации элементов инфильтрата на границе между клетками новообразования и параканкротной зоной. С изменением клинической стадии от I к III определяется увеличение клеточной плотности лимфоцитарного инфильтрата вокруг опухолевого узла с миграцией Т-клеток хелперов на границу параканкротной зоны и опухоли, с проникновением данных клеток

в строму новообразования. Вместе с тем, Т-клетки цитотоксические и естественные киллеры группируются преимущественно на границе с опухолью, формируя очаги, «гнездные» скопления с минимальной тенденцией к проникновению в пласты опухолевых клеток.

Начальная клиническая стадия плоскоклеточной ороговевающей карциномы гортани характеризуется наличием в параканкротной зоне тонких, слабопетлистых артериоло-венулярных сосудистых сетей с точечными мелкими просветами. Сосуды МЦР локализуются преимущественно на границе опухоли и параканкротной зоны. На более поздних клинических стадиях местно распространенного рака гортани (II и III стадия) наблюдается увеличение плотности сосудов МЦР в зоне демаркации, диаметра их просветов, а также наличием вокруг сосудов, иногда с тенденцией к образованию периваскулярных муфт, цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8-позитивные клетки), естественных киллеров (CD56-позитивные лимфоциты).■

Шаманова А.Ю., врач-патологоанатом ГБУЗ «ЧОКОД», заочный аспирант кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; 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; 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:

- Новицкий, В.В. Патология / В.В. Новицкий, Е.Д. Гольдберг, О.И. Уразова. - М.: ГЕОТАР - Медиа, 2009. --- Т.1. - гл. 13.
- Абелев, Г.И. Иммунология опухолей человека / Г.И. Абелев // Природа. - 2000. - №2. - 20-25 с.
- Аничков, Н.М. Биология опухолевого роста (молекулярно-медицинские аспекты) / Н.М. Аничков, И.М. Кветной, С.С. Коновалов. — СПб: Прайм-ЕВРОЗНАК, 2004. — 224 с.
- Данилова, И.А. Морфологические особенности паренхиматозного компонента основных гистологических форм рака желудка / И.А. Данилова // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. - 2011. - №1. - 8-13 с.
- Крючков, А. Н. Неоплазмоз и плотность сети микрососудов в раке молочной железы / А. Н. Крючков, Г. Г. Фрейнд // Архив патологии. — 2008. — 70 (1). - 62-5 с.
- Тупицын, Н.Н. Иммунофенотип рака молочной железы. Рак молочной железы / под ред. Н.Е. Кушлинского, С.М. Портного, К.П. Лактионова. — М.: РАМН, 2005. — 174-197 с.
- 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 // Материалы научно-практической патологоанатомической конференции Южного Урала с участием патологоанатомов других регионов, России и СНГ, посвященной 30-летию основания Челябинского областного патологоанатомического бюро. — Челябинск, 2014. — 33-35 с.

Шаманова А.Ю., Казачков Е.Л., Семенова А.Б.
Сосуды и лимфоцитарный инфильтрат как компоненты микроокружения опухоли при местнораспространенном раке гортани

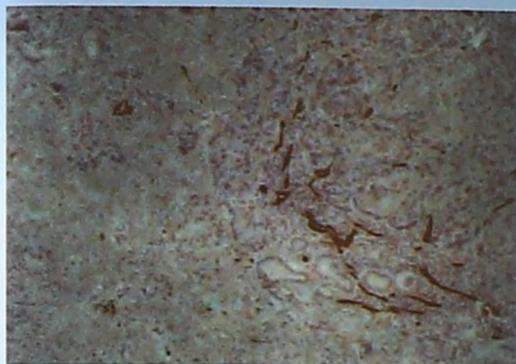


Рисунок 1. Рак гортани I клинической стадии (T1N0M0).

Сосуды МЦР параканкротической зоны, ув.10x10
Иммуногистохимическое исследование (CD34).

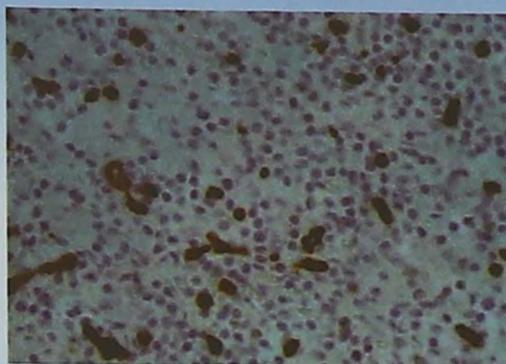


Рисунок 2. РГ I клинической стадии (T1N0M0).

Сосуды МЦР параканкротической зоны, ув.10x40
Иммуногистохимическое исследование (CD34).

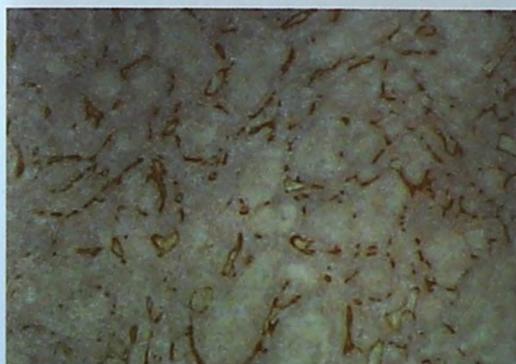


Рисунок 3. РГ II клинической стадии (T2N0M0).

Сосуды МЦР параканкротической зоны, ув.10x10
Иммуногистохимическое исследование (CD34).

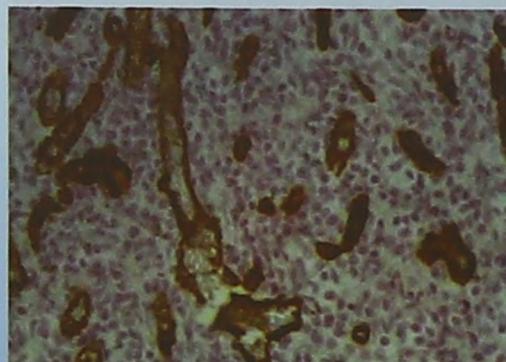


Рисунок 4. РГ II клинической стадии (T2N0M0).

Сосуды МЦР параканкротической зоны, ув.10x40
Иммуногистохимическое исследование (CD34).



Рисунок 5. РГ III клинической стадии (T3N0M0).

Сосуды МЦР параканкротической зоны, ув.10x10
Иммуногистохимическое исследование (CD34).

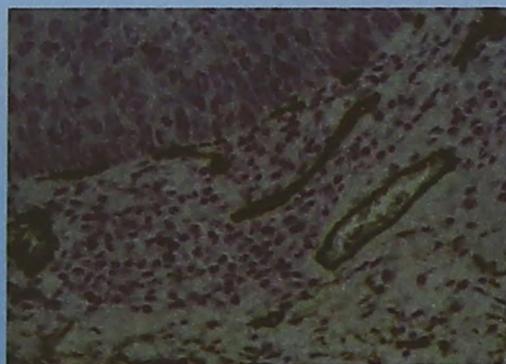


Рисунок 6. РГ III клинической стадии (T3N0M0).

Сосуды МЦР параканкротической зоны, ув.10x40
Иммуногистохимическое исследование (CD34).