

Исаева О.И., Семенова А.Б., Важенин А.В.

Сравнительная оценка иммунологического микроокружения при исследовании трепанобиоптатов и операционного материала инвазивной карциномы молочной железы

ГБУЗ «Челябинской областной клинический центр онкологии и ядерной медицины», г. Челябинск

Isaeva O.I., Semenova A.B., Vazhenin A.V.

Comparative evaluation of the immunological microenvironment in the study of trepanbioplates and surgical material for invasive breast carcinoma

Резюме

Цель исследования - оценить различия представительства субпопуляций лимфоцитов в биопсийном и операционном материале инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа при морфологической диагностике и иммуногистохимическом исследовании с целью определения достаточного объема тканевого материала для достоверного исследования опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) в карциноме молочной железы. Объектом исследования послужил биопсийный и операционный материал от 60 пациенток в возрасте от 37 до 78 лет с диагнозом инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа. Обнаружено, что количество Т-хелперов в операционном материале вне зависимости от степени злокачественности преобладают по сравнению с биопсийным. Похожие различия выявлены при оценке естественных киллеров и CD20 положительных лимфоцитов, но не столь отчетливо. И только CD8 позитивные лимфоциты позволяли оценивать их без статистически значимых различий как в биопсийном, так и в операционном материале.

Ключевые слова: карцинома молочной железы, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, иммунный ответ

Summary

The aim of the study was to assess the differences in the representation of lymphocyte subpopulations in biopsy and surgical material for non-specific invasive breast carcinomas in morphological diagnostics and immunohistochemical studies in order to determine sufficient tissue material for reliable study of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast carcinoma. The object of the study was biopsy and surgical material from 60 patients aged 37 to 78 years with a diagnosis of invasive breast carcinoma of a non-specific type. It was found that the number of T-helpers in the surgical material, regardless of the degree of malignancy, is higher than in the biopsy one. Similar differences were found in the assessment of natural killer cells and CD20 positive lymphocytes, but not so distinctly. And only CD8 positive lymphocytes allowed us to evaluate them without statistically significant differences in both biopsy and surgical material.

Key words: breast carcinoma, tumor-infiltrating lymphocytes, immune response

Введение

В настоящее время общепризнанно, что иммунная система играет важную роль в течение заболевания у пациентов больных раком. Однако оценка иммунного ответа на опухоль у отдельных пациентов затруднена [1]. У пациентов с злокачественными опухолями выявлены изменения фенотипа и функции лимфоцитов периферической крови [2]. Показано, что изменения, обнаружен-

ные в периферической крови, не обязательно отражают ситуацию в микроокружении опухоли. Известно, что субпопуляционный состав интраопухолевых лимфоцитов у больных раком молочной железы (РМЖ) имеет клиническое значение [3,4]. Одним из важных прогностических факторов в развитии карциномы молочной железы является инфильтрация ее стромы иммунными клетками, в том числе опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами

(TILs) [1]. Полиморфно-клеточный инфильтрат стромы состоит из различных популяций клеток, включая лимфоциты, макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты, дендритные клетки или тучные клетки. Среди популяций лейкоцитов, проникающих в опухоли, лимфоциты были изучены наиболее широко. В лейкоцитарном инфильтрате Т-лимфоциты составляют 75% клеток, доля В-лимфоцитов ниже 20%, моноциты составляют менее 10% клеток, а Т-клетки естественных киллеров и естественных киллеров составляют менее 5% всех лейкоцитов [5]. В связи с тем, что на сегодняшний день неоадьювантная терапия широко применяется, встает вопрос, в каком материале, биопсийном или операционном, и с помощью каких методов, следует оценивать его.

Цель исследования - оценить различия представительства субпопуляций лимфоцитов в биопсийном и операционном материале инвазивных карцином молочной железы в рутинной морфологической диагностике и при иммуногистохимическом исследовании с целью определения достаточного объема тканевого материала для достоверного исследования опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) в карциноме молочной железы.

Материалы и методы

Объектом исследования послужили биопсийный и операционный материал от 60 пациенток в возрасте от 37 до 78 лет с диагнозом инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа. Диагноз был установлен по морфологическому заключению по трепан-биоптатам в ГБУЗ «Челябинском областном клиническом центре онкологии и ядерной медицины». После хирургического лечения был исследован операционный материал. Критерий включения: инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа низкой и умеренной степени злокачественности по Ноттингемской классификации [6,7,8]. Критерий исключения: неоадьювантное лечение.

Для световой микроскопии образцы, полученные после трепанобиопсии и операции, заливались в парафиновые блоки. Серийные гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Иммуногистохимические исследования для оценки субпопуляций Т и В-лимфоцитов проводились с использованием антител CD4 (Clone 4B12), CD8 (Clone SP57), CD20 (Clone L26), CD56 (Clone 123C3).

Иммуногистохимическое исследование CD4 (Clone 4B12) проведено на Autostainer Plus (Dako). Обработка материала выполнена с использованием Target Retrieval Solution в PTLINK (Dako) при условиях 97C, 20 мин.

Иммуногистохимическое исследование CD8 (Clone SP57), CD20 (Clone L26), CD56 (Clone 123C3) проведено на Ventana Autostainer Benchmark ULTRA (universal staining system) с использованием ultra View Universal DAB Detection Kit (Ventana).

Затем микропрепараты помещались в сканирующее устройство «Leica APERIOCS52» для получения цифровых изображений для дальнейшего исследования и анализа.

В операционном материале оценивалась централь-

ная зона опухоли и зона активного опухолевого роста (перитуморальная) и сравнивалась с биопсийным материалом (был взят один столбик). Также сравнительный анализ проводился в зависимости от степени злокачественности опухоли. В данном исследовании учитывался материал от 30 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы низкой степени злокачественности (G1) и от 30 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы умеренной степени злокачественности (G2)

Использовали непараметрические методы статистического исследования: применяли медиану и интерквартильный размах, вариационный анализ производили с помощью критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Первым этапом наших исследований был сравнительный анализ воспалительно-клеточного инфильтрата различных зон (интратуморальной и перитуморальной) операционного материала и биопсийного материала вне зависимости от степени злокачественности опухоли. Как видно из таблицы 1, количество CD4 положительных (Т-хелперов) (рисунок 1 — *рисунки к статье на специальной цветной вкладке журнала — прим. ред.*) в операционном материале, вне зависимости от локализации, достоверно выше, чем в биопсийном. Инфильтрация Т-цитотоксическими лимфоцитами (рисунок 2) была высокой во всех группах наблюдений и достоверно не различалась, равно как и естественных киллеров. Что касается В-лимфоцитов, количество в перитуморальной области достоверно выше, чем в биопсийном материале, а по сравнению с интратуморальной зоной статистически значимых различий нет.

Далее был проанализированы различные области (интратуморальная и перитуморальной) и биопсийный материал. Как видно из таблицы 2, количество Т-хелперов в операционном материале, вне зависимости от локализации, достоверно выше, чем в биопсийном вне зависимости от степени злокачественности. Наиболее высокие значения CD4 позитивные лимфоциты имели в перитуморальной области в карциномах умеренной степени злокачественности. Количество Т-цитотоксических лимфоцитов вне зависимости от расположения и степени злокачественности статистически значимо не различалось. При исследовании В-лимфоцитов (рисунок 3) обнаружено, что их количество в перитуморальной зоне достоверно выше, чем в биопсийном материале в карциномах умеренной степени злокачественности. При этом в карциномах низкой степени злокачественности статистически значимых различий не выявлено. При исследовании Т-хелперов, естественных киллеров, Т-цитотоксических лимфоцитов перитуморальной области в операционном материале отмечается большая инфильтрация этими клетками по сравнению инфильтрации в биопсийном материале вне зависимости от степени злокачественности опухоли. Количество естественных киллеров (рисунок 4) в операционном материале вне зависимости от области (перитуморальной или интратуморальной) по сравнению с биопсийным материалом достоверно больше.

Таблица 1 Структура воспалительно-клеточного инфильтрата в различных зонах исследования в карциномах молочной железы. (n=60)

	ИТЗ (группа 1)	ПТЗ(группа 2)	Б (группа 3)
CD4	152,00[88,08; 185,89] q=[101,50;180,00] p1,2=0,5637 p1,3=0,0351	152,50[141,04; 194,10] q=[143,00; 190,50] p2,3=0,0008	102,50[56,38;139,31] q=[56,38 ;139,31]
CD8	102,50[62,94;117,83] q=[68,50 ;117,50] p1,2=0,9540 p1,3=0,3122	100,50[90,86;111,65] q=[92,50; 111,00] p2,3=0,1842	78,00[36,63; 113,83] q=[36,63; 113,83]
CD20	78,00[22,21;161,42] q=[24,50; 139,50] p1,2= 0,2987 p1,3=0,3123	114,50[48,52; 155,14] q=[49,50; 153,50] p2,3=0,0243	27,50[7,25; 107,10] q=[7,25; 107,10]
CD56	8,5000[4,1728; 17,8272] q=[4,5000; 17,5000] p1,2=0,7727 p1,3=0,1399	8,0000[4,1728 to 16,3089] q=[4,5000 to 15,0000] p2,3=0,1173	3,0000[3,0000 to 6,0000] q=[3,0000 to 6,0000]

ИТЗ-Интрауморальная зона, ПТЗ-Перитуморальная зона, Б-Биопсия.

Таблица 2. Структура воспалительно-клеточного инфильтрата в различных зонах исследования в карциномах молочной железы низкой (G1) и умеренной (G2) степени злокачественности.

	G1 (n=30)			G2 (n=30)		
	ИТЗ (группа 1)	ПТЗ (группа 2)	Б (группа 3)	ИТЗ (группа 1)	ПТЗ (группа 2)	Б (группа 3)
CD4	155,50 [145,80;191,48] q=[150,00;171,00] P1,3= 0,0073	148,00 [140,95;200,75] q=[142,00;185,00] P2,3 = 0,0065	121,50 [71,64;145,25] q=[100,00;140,00]	152,50 [99,52;198,98] q=[120,00;189,00] P1,3= 0,0233	162,50 [136,87;198,10] q=[136,87;198,10] P2,3= 0,0065	102,50 [61,43;133,15] q=[63,00;130,00]
CD8	118,50 [111,90;121,58] q=[114,00; 120,00] P1,3= 0,0696	113,50 [96,95;134,02] q=[98,00; 123,00] P2,3 = 0,1041	85,00 [38,97;132,90] q=[50,00; 114,00]	82,00 [58,90; 102,02] q=[60,00; 91,00] P1,3= 0,8501	96,50 [82,95;103,05] q=[84,00;102,00] P2,3 = 0,3643	79,00 [33,95;112,53] q=[35,00;112,00]
CD20	93,00 [28,48; 218,68] q=[28,48; 218,68] P1,3=0,1988	124,50 [42,95;224,67] q=[98,00;123,00] P2,3 = 0,1041	27,50 [12,12;156,77] q=[20,00;109,00]	78,00 [23,17; 141,95] q=[30,00; 101,00] P1,3= 0,4274	124,00 [50,48;150,52] q=[51,00;150,00] P2,3 = 0,0113	33,50 [16,95;99,05] q=[18,00; 98,00]
CD56	16,00 [5,48; 20,15] q=[6,00; 17,00] P1,3= 0,0201	13,00 [5,47;18,56] q=[6,00;17,00] P2,3 = 0,0082	3,00 [2,48;4,58] q=[3,00;3,00]	9,00 [3,48; 28,98] q=[4,00; 19,00] P1,3=0,0530	6,50 [4,00;18,99] q=[4,00; 9,00] P2,3 = 0,0082	3,00 [2,48;5,53] q=[3,00; 5,00]

В результате проведенного исследования обнаружено, что структура полиморфно-клеточного инфильтрата опухоли различается в операционном и биопсийном материале, как при анализе без учета степени злокачественности, так и, особенно выражено, при выделении групп исследования по степеням злокачественности. Также выявлено, что количество Т-хелперов в операционном материале вне зависимости от степени злокачественности выше, чем в биопсийном. Похожие различия выявлены при оценке естественных киллеров и CD20 положительных лимфоцитов, но не столь отчетливо. И только CD8 позитивные лимфоциты позволяли оценивать их без статистически значимых различий как в биопсийном, так и в операционном материале.

Тем не менее, на сегодняшний день нет четких рекомендаций каким образом оценивать ТИЛ при рутинном исследовании при окраске гематоксилином-эозином, либо специализированным иммуногистохимическим исследованием, а также какие именно популяции клеток полиморфно-клеточного инфильтрата требуется относить к ТИЛs.

Вероятно, если расширить группы исследования, либо изменить количество исследуемых фрагментов (толбиков ткани при кор-биопсии), исследованные группы будут сопоставимы и ТИЛs возможно будет достоверно исследовать при рутинной окраске гематоксилином-эозином. Либо потребуется специализированное иммуноги-

стохимическое исследование с выделением субпопуляций лимфоцитов. ■

Исаева О.И., врач-патологоанатом ГБУЗ ЧОКЦОиЯМ; **Семенова А.Б.**, д.м.н., заведующая лабораторно-диагностической службы ГБУЗ ЧОКЦОиЯМ;

Важенин А.В., академик РАН, д.м.н., профессор кафедры онкологии, лучевой диагностики и лучевой терапии, главный врач ЧОКЦОиЯМ. Автор, ответственный за переписку- Исаева О.И., okigis@mail.ru 454087 г.Челябинск, ул. Блюхера, д.426 ГБУЗ ЧОКЦОиЯМ, тел: +79512361088

Литература:

1. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Иммунология гемопоза ; 2009, 8-50.
2. Melichar B, Jandik P, Krejsek J, Solichova D, Drahosova M, Skopec F, Mergancova J, Voboril Z: Mitogen-induced lymphocyte proliferation and systemic immune activation in cancer patients. Tumori 82: 218-220, 1996
3. Безнос О.А., Буров Д.А., Сельчук В.Ю. Взаимосвязь субпопуляций интралимфатических лимфоцитов с клиническими и патоморфологическими особенностями рака молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы. 2016;13-17
4. Шапилов Ф.А., Вишневецкая Я.В., Сельчук В.Ю., Погодина Е.М., Зернов Д.И. Возможности изучения субпопуляций интралимфатических лимфоцитов методом проточной цитометрии на материале кор-биопсии опухоли у больных раком молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы. 2012;29-33
5. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A: CD4+ follicular helper T-cell infiltration predicts breast cancer survival. J Clin Invest 123: 2013, 2873-2882
6. Франк Г.А, Данилова Н.В., Андреева Ю.Ю. Классификация опухолей молочной железы ВОЗ 2012
7. S.Lakhani, I.O.Ellis,M.J.van de Vijver WHO Classification of Tumours of the Breast , No 4 Fourth Edition , 2012, 8
8. Elston C.W., Ellis I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up //Histopathology. -1991- Vol. 19.-P.403-410.

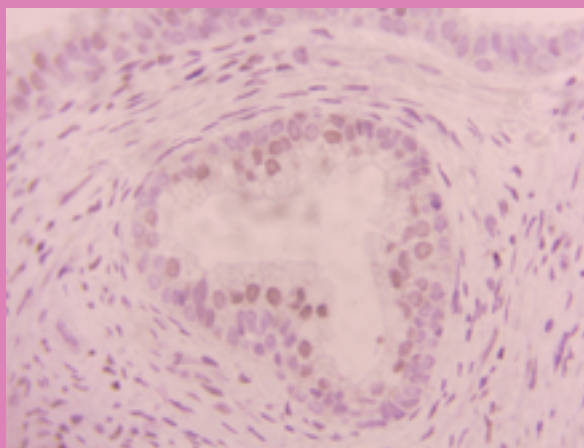


Рисунок 10. Экспрессия маркера рецепторов андрогенов нормальным эпителием секреторного типа предстательной железы (группа контроля)

Стрептавидин-биотиновый метод с докраской ядер гематоксилином, система детекции – REVEAL – Biotin-Free Polyvalent DAB («SPRING bioscience», США), хромоген – диаминобензидин. X400

Исаева О.И., Семенова А.Б., Важенин А.В.

Сравнительная оценка иммунологического микроокружения при исследовании трепанобиоптатов и операционного материала инвазивной карциномы молочной железы.

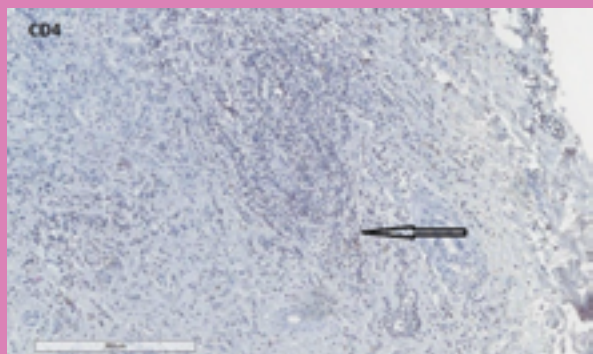


Рисунок 1- Единичные CD4 позитивные лимфоциты инфильтрата карциномы молочной железы. Иммуногистохимический метод исследования; x300

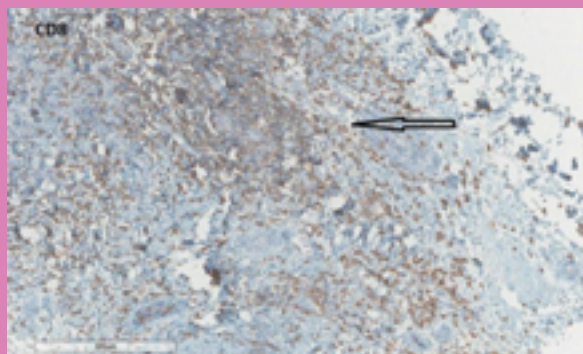


Рисунок 2- Множество CD8 позитивных лимфоцитов инфильтрата карциномы молочной железы. Иммуногистохимический метод исследования; x300

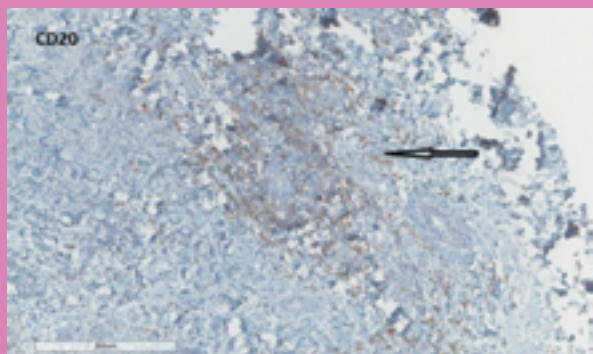


Рисунок 3- Комплексы CD20 позитивных лимфоцитов инфильтрата карциномы молочной железы. Иммуногистохимический метод исследования; x300

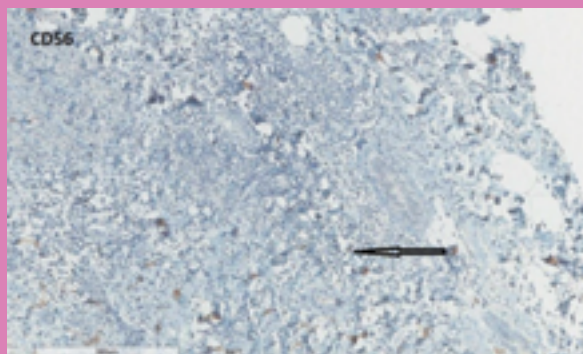


Рисунок 4- Единичные CD56 позитивные лимфоциты инфильтрата карциномы молочной железы. Иммуногистохимический метод исследования; x300