

Роль воспалительного компонента опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки при различных исходах заболевания

Д.А. Зиновкин

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»;
Республика Беларусь, 246040, Гомель, ул. Ильича, 290

Контакты: Дмитрий Александрович Зиновкин zinych007@yandex.ru

Представлены данные о прогностической значимости опухоль-ассоциированных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, естественных киллеров, макрофагов и дендритных клеток в отношении эндометриоидной аденокарциномы. Также определена их роль в ранней (до 3 лет) прогрессии данного заболевания.

Ключевые слова: опухолевое микроокружение, прогноз, эндометриоидная аденокарцинома

DOI: 10.17650/1994-4098-2016-12-1-73-78

The role of tumor inflammatory component of the tumor microenvironment of the endometrioid adenocarcinoma of the corpus uteri in different disease outcomes

D.A. Zinovkin

Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology; 290 Il'icha St., Gomel', 246040, Republic of Belarus

This article presents data on the role of tumor associated T cells, B cells, natural killer cells, macrophages and dendritic cells in the prognostic value of the endometrioid adenocarcinoma. Furthermore, there was determining of its role in the early (up to 3 years) progression of the disease.

Key words: tumor microenvironment, prognosis, endometrioid adenocarcinoma

Введение

Микроокружение большинства эпителиальных опухолей состоит из разрастающихся клеток эпителиального компонента опухоли и десмопластической стромы, к которой относятся стромальные клетки, сосудистая сеть и инфильтрат иммунных клеток. Локальный иммунный ответ играет важную роль в защите организма от прогрессирования и инвазии злокачественной опухоли [1]. Известно, что воспалительные клетки, инфильтрирующие опухоль, представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из разных субпопуляций: опухоль-ассоциированных Т-лимфоцитов (ОАТ), опухоль-ассоциированных В-лимфоцитов (ОАВ), опухоль-ассоциированных естественных киллеров (ЕК), опухоль-ассоциированных макрофагов (ОАМ) и дендритных клеток (ДК). Роль данной воспалительной инфильтрации при злокачественных новообразованиях до сих пор до конца не ясна. Изначально предполагалось, что воспалительные клетки, ассоциированные с опухолью, проявляют исключительно противоопухолевое действие. Однако регрессия злокачественных образований под действием иммунной системы встречается крайне редко. И более того,

известно, что некоторые популяции макрофагов зачастую проявляют функции, способствующие опухолевому ангиогенезу [2].

Наиболее часто выявляемым типом рака эндометрия является эндометриоидная аденокарцинома (ЭА) которая выявляется, по мнению ряда авторов, в 75–90 % всех случаев [3, 4]. Несмотря на это, на сегодняшний день роль различных клеток локального иммунного ответа в развитии и прогнозе ЭА тела матки изучена недостаточно.

Материалы и методы

Характеристика пациенток. В исследовании использовались данные Белорусского канцер-регистра и архивный гистологический материал 60 пациенток с патогистологически верифицированным диагнозом ЭА I–III стадии (FIGO, 2009). Пациентки были разделены на 2 группы: в 1-ю вошли женщины, имевшие рецидивы либо умершие от ЭА в течение 5 лет после постановки диагноза (неблагоприятный исход); во 2-ю — не имевшие рецидивов в течение данного периода (благоприятный исход). Группы были равнозначны по клинической стадии заболевания, степени

дифференцировки опухоли и получаемому лечению. Средний возраст больных в группе с благоприятным исходом составил $62,7 \pm 10,1$ года; с неблагоприятным — $65,2 \pm 9,6$ года.

Иммуногистохимическое окрашивание. Для исследования готовили срезы толщиной 3–4 мкм, которые монтировали на обработанные L-полилизинном предметные стекла. Иммуногистохимическую реакцию проводили на срезах, полученных с парафиновых блоков опухолей, фиксированных в формалине и прошедших обычную проводку с использованием высокотемпературных методов восстановления антигенной иммунореактивности (обработка в микроволновой печи). В данном исследовании использовали первичные моноклональные мышиные антитела (Diagnostic Biosystems, США): для выявления ОАМ — антитела к CD68, ОАТ — к CD3, ОАВ — к CD20, ЕК — к CD57 и для детекции ДК — антитела к S100. Визуализацию результатов иммуногистохимической реакции и контрокрашивание гематоксилином проводили с помощью системы визуализации антител Mouse UnoVue™ HRP/DAB Detection System Kit (Diagnostic Biosystems, США).

Морфометрическое исследование. Микропрепараты фотографировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse 50i с цифровой фотокамерой DS-F1 с разрешением 1689 на 1415 пикселей в 5 неперекрывающихся полях зрения. Подсчет параметров проводили с использованием пакета прикладных программ для анализа изображений. Все измерения осуществляли при увеличении $\times 400$, площадь одного поля зрения составляла $6299,11 \times 397,67 = 118\,952,07$ мкм². Экспрессию антител оценивали исходя из процента иммуногистохимически позитивных клеток на 100 клеток в поле зрения, результат выражали в процентном содержании позитивных клеток.

Статистический анализ. Обработку данных проводили с использованием пакета программ MedCalc v15.4. При сравнении исследуемых групп по иммуногистохимическим критериям применяли ROC-анализ (данные были представлены медианой, нижним и верхним квартилями). Обязательным компонентом ROC-анализа являлось определение доверительного интервала (ДИ) и площади под ROC-кривой (AUC). При AUC 0,9–1,0 качество прогностической модели признается отличным; 0,8–0,9 — очень хорошим; 0,7–0,8 — хорошим; 0,6–0,7 — средним; 0,5–0,6 — неудовлетворительным [5].

Пороговые значения показателей, полученных при ROC-анализе, были использованы для расчета относительного риска (ОР) раннего (до 3 лет) неблагоприятного исхода заболевания. Для этого все пациентки были перераспределены на 2 группы: 1-я — с ранней (до 3 лет) прогрессией заболевания и гибелью пациенток; 2-я — прожившие более 3 лет после постановки диагноза. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты

В данном исследовании в группе с неблагоприятным исходом медиана экспрессии CD3 составляла 28,8 % (9,4–62,1 %); в группе с благоприятным исходом — 43,8 % (14,8–53,4 %). При проведении ROC-анализа экспрессии CD3 установлено, что AUC составила 0,868 (ДИ 0,746–0,942; $p < 0,001$). Чувствительность составила 83,3 % (ДИ 65,3–94,4), специфичность — 96,7 % (ДИ 82,8–99,9), пороговое значение показателя — 36,9 %.

Экспрессия CD3 проявлялась в виде коричневого окрашивания мембран и цитоплазмы ОАТ различной интенсивности в зоне инвазии ЭА, с расположением данных клеток преимущественно возле железистого компонента опухоли (рис. 1).

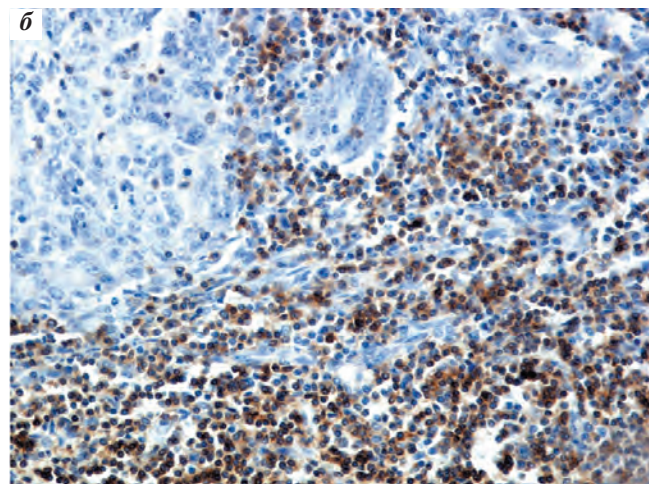
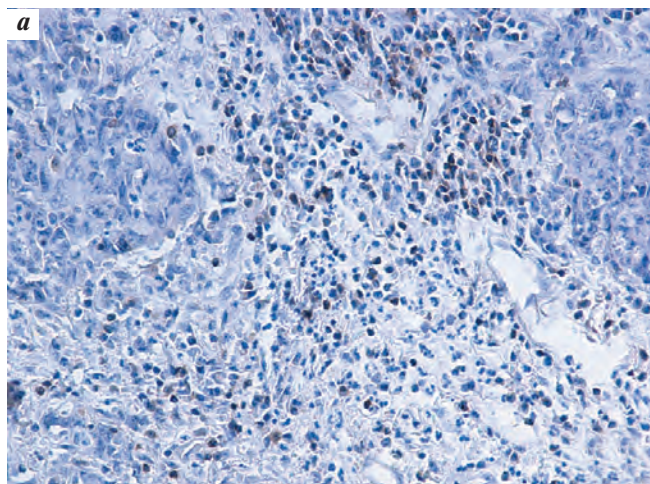


Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD3 в ОАТ: а — неблагоприятный исход; б — благоприятный исход. $\times 100$.
Здесь и на рис. 2–5: хромоген — диаминобензидин; контрокрашивание гематоксилином Майера

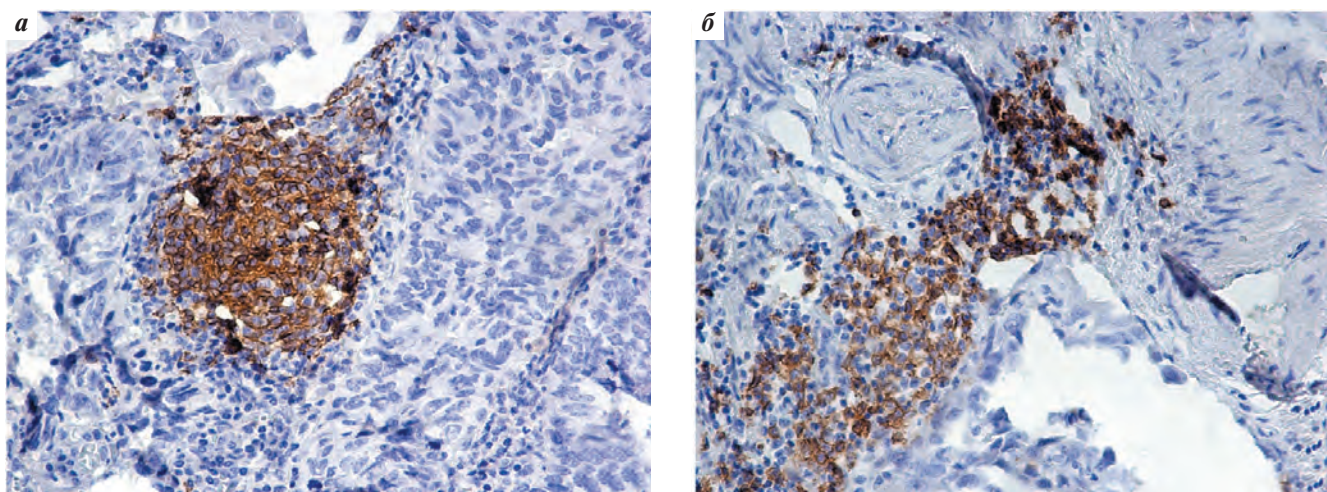


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD20 в ОАВ: а — неблагоприятный исход; б — благоприятный исход. $\times 200$

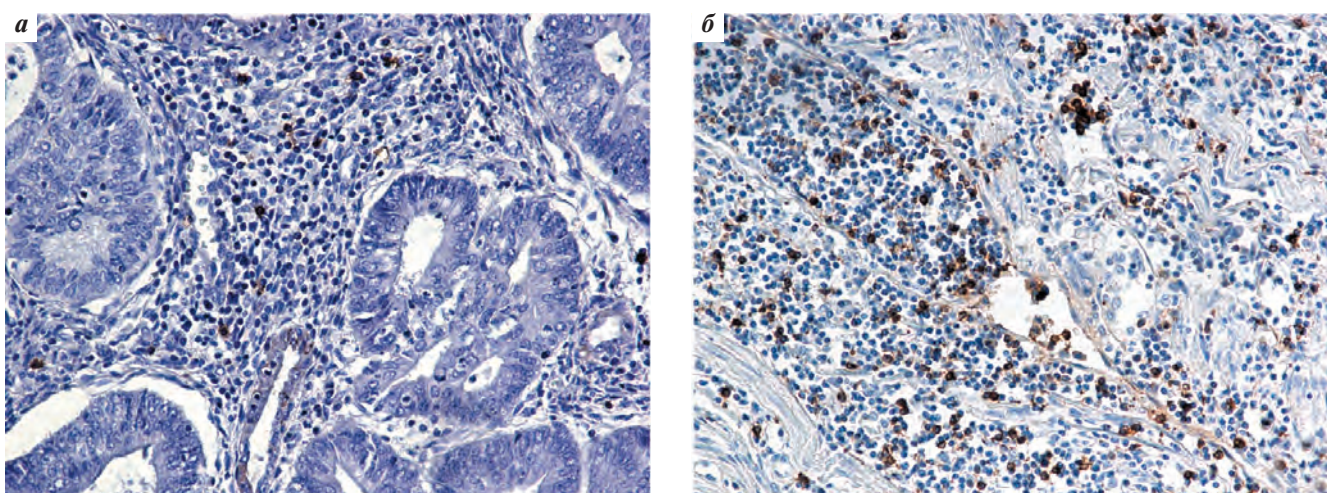


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD57 в ЭА: а — неблагоприятный исход; б — благоприятный исход. $\times 100$

В 1-й группе больных ЭА медиана экспрессии CD20 составляла 37,2 % (0–65,2 %); во 2-й — 35,5 % (30,8–52,7 %). AUC при проведении ROC-анализа экспрессии CD20 ОАВ была равна 0,638 (ДИ 0,504–0,758; $p = 0,074$). Чувствительность составила 46,7 % (ДИ 28,3–65,7), специфичность — 96,7 % (ДИ 82,8–99,9), пороговое значение показателя — 38,1 %.

ОАВ имели хорошо выраженное мембранное окрашивание; отмечались очаги плотно расположенных ОАВ, формирующие округлые инфильтраты (рис. 2).

Медиана экспрессии CD57 в группе с благоприятным исходом составляла 24,3 % (0–47,4 %); в группе с неблагоприятным исходом — 45,6 % (22,0–71,4 %). При проведении ROC-анализа экспрессии CD57 установлено, что AUC была равна 0,909 (ДИ 0,807–0,968; $p < 0,0001$). Чувствительность составила 83,3 % (ДИ 65,3–94,4), специфичность — 96,7 % (ДИ 82,8–99,9), пороговое значение показателя — 30,8 %.

При иммуногистохимическом исследовании в ЕК-клетках определялось окрашивание цитоплазмы

и мембраны. Степень инфильтрации данными клетками зоны инвазии ЭА варьировала от слабой до умеренной (рис. 3).

В группе пациенток с неблагоприятным исходом ЭА медиана экспрессии CD68 составляла 38,2 % (15,3–65,7 %); в группе с благоприятным исходом — 64,6 % (44,5–84,2 %). AUC при проведении ROC-анализа экспрессии CD68 ОАМ была равна 0,918 (ДИ 0,818–0,973; $p < 0,0001$). Чувствительность составила 76,7 % (ДИ 57,7–90,1), специфичность — 96,7 % (ДИ 82,8–99,9), пороговое значение показателя — 45,5 %.

Экспрессия CD68 определялась как коричневое окрашивание цитоплазмы ОАМ различной степени интенсивности. Макрофаги располагались в виде инфильтратов различной степени выраженности по периферии опухоли (рис. 4).

В 1-й группе больных ЭА медиана экспрессии S100 составляла 27,2 % (0–72,5 %); во 2-й — 28,05 % (17,7–36,9 %). AUC при проведении ROC-анализа экспрессии S100 ДК составила 0,508 (ДИ 0,375–0,639;

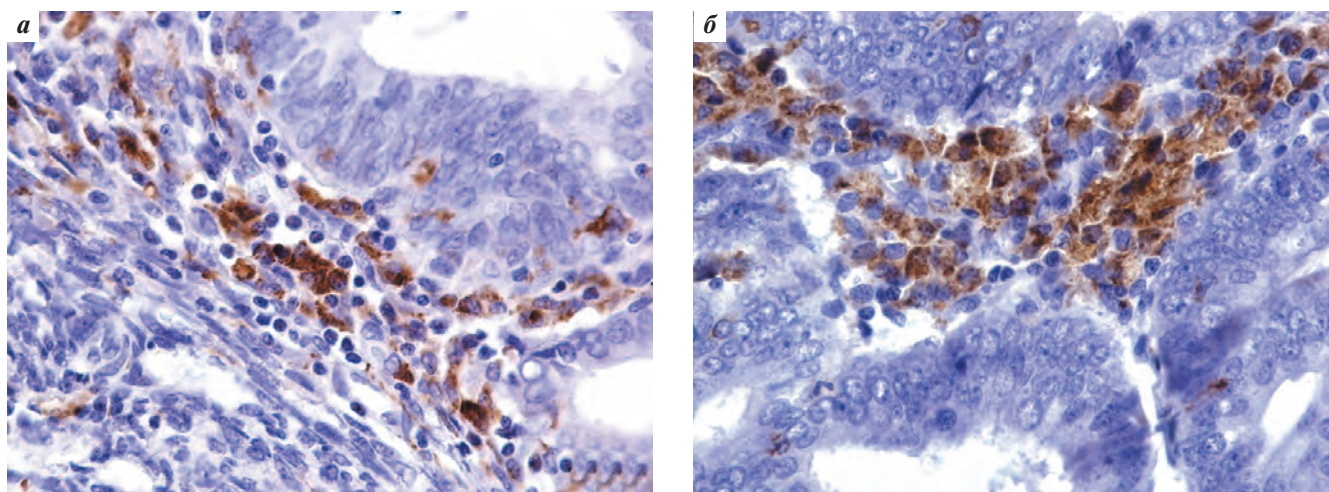


Рис. 4. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD68 в ЭА: а — неблагоприятный исход; б — благоприятный исход. $\times 400$

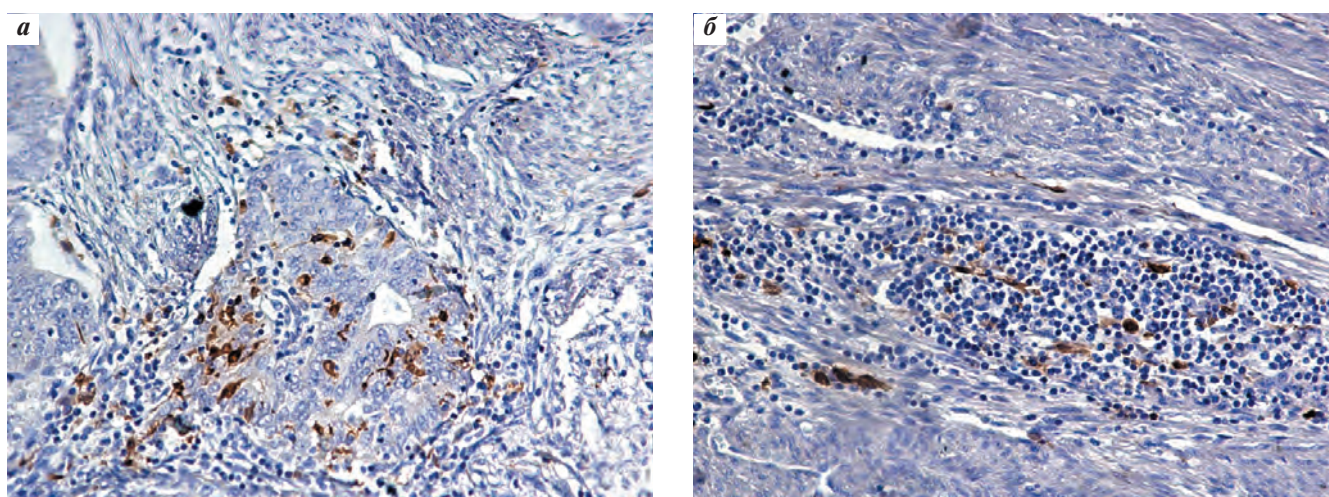


Рис. 5. Иммуногистохимическая реакция с антителами к S100 в ЭА: а — неблагоприятный исход; б — благоприятный исход. $\times 100$

$p = 0,923$). Чувствительность составила 30 % (ДИ 14,7–49,4), специфичность — 100 % (ДИ 88,4–100), пороговое значение показателя — 36,9 %.

S100 экспрессировался на ДК, окрашивая их в коричневый цвет различной интенсивности. В группах с благоприятным и неблагоприятным исходом определялись ДК, формирующие слабо выраженные инфильтраты стромы и желез (рис. 5).

На основании пороговых значений иммуногистохимических маркеров в группу пациенток, проживших менее 3 лет, вошли 25 больных, в группу проживших более 3 лет — 35. Для сравнительного анализа между группами пациенток был проведен расчет ОР раннего неблагоприятного исхода заболевания (см. таблицу).

Расчет ОР показал, что факторами риска неблагоприятного исхода заболевания являются следующие прогностические критерии: низкая экспрессия CD3 (ОР 7,7; 95 % ДИ 0,4–19,6; $p < 0,001$), CD68 (ОР 4,2; 95 % ДИ 0,6–9,1; $p < 0,001$); гиперэкспрессия CD20

(ОР 5,6; 95 % ДИ 0,8–17,8; $p < 0,001$) и S100 (ОР 12,6; 95 % ДИ 0,9–93,2; $p < 0,001$).

Обсуждение

ОАТ составляют основную популяцию иммунных клеток, инфильтрирующих злокачественные образования, и считаются необходимыми для эффективной элиминации малигнизированных клеток. Выраженная инфильтрация опухоли CD3⁺ Т-лимфоцитами ассоциирована с благоприятным прогнозом различных типов рака эндометрия [6]. Кроме того, Р. Čermáková и соавт. (2014) отмечали снижение CD3⁺-клеток в строме опухолей III–IV стадии и у пациенток с высоким риском рецидивов рака эндометрия [7].

Инфильтрация ЕК-клетками, расположенными в строме опухоли, имеет благоприятное прогностическое значение в течении рака эндометрия. Однако по мнению К. Ino и соавт. (2008) ЕК-клетки не влияют на прогноз течения ЭА [8], что и было подтверждено в нашем исследовании.

Сравнительный анализ иммуногистохимических показателей у пациенток с различными исходами ЭА

Показатель, %	Исход заболевания, л (%)		p	ОР (95 % ДИ)
	прожили менее 3 лет	прожили более 3 лет		
CD3	< 36,9	22 (88)	< 0,001	7,7 (0,4–19,6)
	> 36,9	3 (12)		
CD20	< 38,1	13 (52)	< 0,001	5,6 (0,8–17,8)
	> 38,1	12 (48)		
CD57	< 30,8	20 (80)	0,815	1,4 (0,7–4,3)
	> 30,8	5 (20)		
CD68	< 45,5	18 (72)	< 0,001	4,2 (0,6–9,1)
	> 45,5	7 (28)		
S100	< 36,9	16 (64)	< 0,001	12,6 (0,9–93,2)
	> 36,9	9 (36)		

Известно, что ОАМ играют важную роль в канцерогенезе опухолей и в противоопухолевом иммунном ответе. При этом отмечается амбивалентность их функций: с одной стороны, они оказывают цитотоксический эффект на опухолевые клетки, с другой — инициируя отторжение рака, стимулируют рост, метастазирование и ангиогенез опухоли [9].

Полученные нами данные позволили определить влияние отдельных факторов клеточного иммунного ответа на течение ЭА. По данным литературы, снижение количества ОАТ, ЕК-клеток и ОАМ является фактором неблагоприятного исхода заболевания [10]. В нашем исследовании эти данные подтвердились ($p < 0,001$).

Высокая экспрессия CD20 ОАВ в нашем исследовании может быть ассоциирована со снижением общего количества ОАТ и ЕК-клеток в перитуморозном инфильтрате при неблагоприятном исходе заболевания ($p < 0,001$).

Большое количество S100-позитивных ДК также было ассоциировано с неблагоприятным исходом ЭА. В литературе существует только одна публикация, указывающая на связь выраженной инфильтрации ДК с прогрессией рака [11].

Выводы

Экспрессия клетками локального иммунного ответа маркеров CD3, CD57 обладает хорошей прогностической силой, а CD68 — отличной. В связи с этим данные маркеры могут применяться как иммуногистохимические предикторы течения ЭА.

При наблюдаемой низкой общей выживаемости (менее 3 лет) чаще наблюдается гиперэкспрессия CD20 ($p < 0,001$) и S100 ($p < 0,001$), а также низкая экспрессия CD3 ($p < 0,001$), CD57 ($p < 0,001$), CD68 ($p < 0,001$). Это может быть проявлением локального клеточного иммунодефицита как отдельного фактора прогрессии ЭА.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Shurin M.R., Umansky V., Malyguine A. The tumor immunoenvironment. Ed. by M.R. Shurin. New York: Springer, 2013. Pp. 19–125.
- Жарков Н.В., Нуртазин С.Т., Жаркова И.М. Особенности морфологии и распределения опухоль-ассоциированных макрофагов в colorectal карциномах. Вестник Казахского национального университета им. аль-Фараби. Серия Биологическая 2009; 42(3):72–6. [Zharkov M.R., Nurtazin S.T., Zharkova I.M. The morphology and distribution of tumor associated macrophages in colorectal carcinomas. Vestnik Kazakhskogo natsional'nogo universiteta im. al'-Farabi. Seriya Biologicheskaya = Bulletin of al-Farabi Kazakhstan National University. Biological Series 2009; 42(3):72–6. (In Russ.)].
- Damjanov I., Fan F. Cancer grading manual. Ed. by I. Damjanov. New York: Springer, 2013.
- World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon, 2000.
- Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ Statistica. М.: Медиа-сфера, 2002. [Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. The use of applied programs Statistica. Moscow: Mediasfera, 2001. (In Russ.)].
- Jochims C., Schlom J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential

link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med* (Maywood) 2011;236(5):567–79.

7. Čermáková P., Melichar B., Tomšová M. et al. Prognostic significance of CD3⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 2014;34(10):5555–61.

8. Ino K., Yamamoto E., Shibata K. et al. Inverse correlation between tumoral

indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res* 2008;14(8):2310–7.

9. Klink M. Cancer immunoediting: elimination, equilibrium, and immune escape in solid tumors. Ed. by M. Klink. New York: Springer, 2013.

10. Modugno F., Ness R.B., Chen C., Weiss N.S. Inflammation and endometrial cancer: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(12):2840–7.

11. Aviary C., LaRue H., Hovington H. et al. High level of mature tumor-infiltrating dendritic cells predicts progression to muscle invasion in bladder cancer. *Hum Pathol* 2013;44(8):1630–7.