

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ И ПРОТОЧНО-ЦИТОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНТРАТУМОРАЛЬНЫХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ СЕРОЗНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЯИЧНИКОВ

Е.В. Зуева, С.О. Никогосян, В.В. Кузнецов, А.В. Моженкова,
Н.В. Кокосадзе, В.В. Тимошенко, М.Ж. Каирбаева, Н.Н. Тупицын
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND FLOW CYTOMETRIC CHARACTERISTICS OF INTRATUMORAL LYMPHOCYTES IN OVARIAN SEROUS ADENOCARCINOMA

E.V. Zuyeva, S.O. Nikogosyan, V.V. Kuznetsov, A.V. Mozhenkova,
N.V. Kokosadze, V.V. Timoshenko, M.Zh. Karibayeva, N.N. Tupitsyn
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Intratumoral T-lymphocyte subpopulations were studied in 27 patients with ovarian serous adenocarcinoma, by using immunohistochemical techniques (n = 27) and three-color flow cytometry (n = 11).

The subpopulations of intratumoral lymphocytes infiltrating the tumor parenchyma and stroma differed. The intraepithelial cells were mainly CD8⁺ T cells (30.7%) and CD56⁺ lymphocytes (25%), which were indicative of the predominance of NK cells. Stromal infiltration was primarily presented by mature CD3⁺ T lymphocytes (33%). This was supported by flow cytometric studies; CD3⁺ constituted 62–92.6% among the CD45⁺ intratumoral leukocytes. The CD3⁺CD8⁺/CD3⁺CD4⁺ ratio was > 2 only in 3 cases. CD25⁺ cells made up the bulk among the CD3⁺CD4⁺ lymphocytes - 30–60% in 6 patients

Key words: ovarian serous adenocarcinoma, immunohistochemistry, flow cytometry, tumor-infiltrating lymphocytes

Введение

Лечение больных раком яичников (РЯ) занимает особое место в практической медицине и требует пристального внимания онкологов. По данным Международного агентства по изучению рака, ежегодно в мире регистрируется более 197 тыс. новых случаев РЯ и более 114 тыс. женщин умирают от этого заболевания [1]. РЯ отличается быстрым, скрытым и бессимптомным течением на начальных стадиях. Опухоль распространяется путем имплантационного роста, гематогенного и лимфогенного метастазирования [2].

За последнее десятилетие отмечен неуклонный прирост заболеваемости данной патологией, который составил 8,5% [1]. Несмотря на совершенствование диагностики и лечения заболевания, 5-летний рубеж переживают лишь 1/3 больных РЯ.

На успех лечения и прогноз заболевания влияет ряд клинических и морфологических факторов. Ведущими из них являются стадия заболевания, гистологический тип и степень дифференцировки опухоли.

В настоящее время с целью оптимизации методов лечения не прекращаются исследования, направленные на изучение биологических свойств РЯ. Особый интерес представляет оценка роли иммунной системы в контроле опухолевого роста и, соответственно, в прогнозе заболевания. Значе-

нию механизмов иммунной защиты и эффекторных звеньев противоопухолевого иммунитета при РЯ до сегодняшнего дня уделялось недостаточно внимания.

Прогресс в этом направлении связан с углубленным исследованием субпопуляций лимфоцитов, присутствующих непосредственно в ткани опухоли (интратуморальные лимфоциты), и детальной характеристикой tumor-пенетрирующих лимфоцитов (ТПЛ). Последние обнаруживаются на морфологическом уровне в паренхиме опухоли, и оценка их субпопуляционного состава может быть проведена иммунологическими методами. Н.Н. Тупицыным и соавт. [3] была разработана методика учета ТПЛ. Наиболее важное значение придается исследованию субпопуляций зрелых Т-клеток (CD3⁺), Т-киллеров (CD8⁺), Т-хелперных/индукторных (CD4⁺) и активированных Т-клеток (CD25⁺). Подобные работы проведены при раке органов желудочно-кишечного тракта [4–6] и раке молочной железы [7].

Исследования последних лет ознаменовались важными открытиями значения инфильтрации РЯ зрелыми Т-клетками (CD3⁺) и Т-цитотоксическими лимфоцитами (CD8⁺) в прогнозе заболевания [8, 9].

L. Zang и соавт. [9] одни из первых сообщили о благоприятном влиянии интратуморальных зрелых CD3⁺-лимфоцитов на длительность общей

Специфичность примененных моноклональных антител

CD/МКА	Клеточная экспрессия
CD45 / ICO-58	Лейкоциты
CD7 / ICO-87	T-клетки, субпопуляция натуральных киллеров
CD3 / ICO-90	Зрелые T-клетки
CD8 / ICO31	Цитотоксические T-лимфоциты, субпопуляция натуральных киллеров
CD4 / ICO-86	Хелперные T-лимфоциты, регуляторные T-клетки
CD56 / My31	Натуральные киллеры
CD20 / L-26	B-клетки

и безрецидивной выживаемости при РЯ ($p < 0,001$), в другом исследовании [10] аналогичные данные получены у больных серозной аденокарциномой яичников при инфильтрации опухоли CD8⁺-лимфоцитами ($p = 0,01$). Следует отметить, что авторы производили подсчет интратуморальных иммунокомпетентных клеток без разделения паренхимы и стромы опухоли.

Позднее именно среди субпопуляций ТПЛ, как независимого благоприятного фактора прогноза выявлена роль CD8⁺-лимфоцитов [8, 11] и зрелых CD3⁺-Т-клеток [12], а в работе В. Clarke и соавт. [13] продемонстрировано значение как CD8⁺-, так и CD3⁺-Т-лимфоцитов ($p = 0,0016$ и $p \leq 0,0001$ соответственно).

Отрицательное же влияние на прогноз при РЯ оказывала высокая пропорция CD4⁺CD25⁺-интратуморальных лимфоцитов [8, 14].

Эти работы свидетельствуют о том, что в настоящее время стандартные клинические и морфологические факторы прогноза могут быть дополнены оценкой уровней инфильтрации опухоли зрелыми Т-клетками и, в частности, Т-киллерами. Это направление исследований представляется весьма актуальным, так как может привести в перспективе к установлению дополнительных иммунологических факторов прогноза.

Цель исследования — детальное изучение субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов у больных серозной аденокарциномой яичников.

Материалы и методы

В исследование включены 27 больных первичной серозной аденокарциномой яичников, которые проходили обследование и лечение в гинекологическом отделении НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в период с 2006 по 2008 г. Возраст больных варьировал от 26 до 77 (медиана 50) лет. Из них 44,4% ($n = 12$) находились в репродуктивном периоде, 55,6% ($n = 15$) — в периоде менопаузы.

Больные с IIIc стадией заболевания составили 77,7% ($n = 21$), Ic — 11,3% ($n = 3$), IV — 7,4% ($n = 2$), IIc — 3,7% ($n = 1$).

Пациенткам было выполнено стандартное обследование, включающее гинекологический осмотр, ультразвуковую томографию органов брюшной полости, малого таза, почек, забрюшинных лимфоузлов, рентгенографию легких, гастро- и колоноскопию. Исходный уровень СА-125 в сыворотке крови варьировал от 52

до 7422 (медиана 832) МЕ/мл. Вне зависимости от стадии опухолевого процесса больные получали комбинированное лечение, состоящее из хирургических вмешательств различных объемов на I этапе и химиотерапии по стандартным схемам с применением таксанов и препаратов платины.

При иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании криостатных срезов опухоли ($n = 27$) проводили подсчет числа интратуморальных иммунокомпетентных клеток на площади 0,34 мм² раздельно в строме и паренхиме новообразования. При этом учитывали эпителиальные и стромальные поля с наиболее выраженной инфильтрацией. Подсчет осуществлялся двумя исследователями независимо друг от друга. Как результирующие показатели фиксировались средние арифметические по данным двух исследователей. Реакцию расценивали как слабую или отрицательную — < 5 клеток в поле зрения микроскопа, × 500, умеренную — 6—19 клеток или выраженную — > 20 клеток [9].

Специфичность примененных антител представлена в таблице.

У 11 больных ИГХ-исследования опухоли были дополнены проточной цитофлуориметрией (ПЦ). Хирургически удаленную опухоль ($n = 11$) дезинтегрировали, получали суспензию клеток на аппарате Medimashin («BD», США). ПЦ-исследования проводили на приборе FACScan («BD», США) с применением тройной флуоресцентной метки. Накапливали максимально возможное количество интратуморальных иммунокомпетентных клеток (CD45⁺).

Панель примененных антител («BD», США):

- 1) CD45PE/Cy5/IgG1PE;
- 2) CD45PE/Cy5/CD3PE/IgG1FITC;
- 3) CD3PE/Cy5/CD8PE/CD4FITC;
- 4) CD3PE/Cy5/CD25PE/CD4FITC.

Математическая обработка данных осуществлялась с использованием программы SPSS.

Результаты

Субпопуляции опухолю-пенетрирующих Т-лимфоцитов (умеренная и выраженная степени инфильтрации) выявлялись в ткани серозной аденокарциномы яичников с различной частотой: CD45 — 59,2% наблюдений, CD7 — 37%, CD56 — 25% (у половины больных клетки опухоли экспрессировали антиген), CD8 — 30,7%, CD3 — 14,8%, CD4 — 11,5%, CD20 — 3,8%. В строме опухоли НК-клеточная инфильтрация (CD56) отмечена реже (8,6%), а частота CD3⁺ и CD7⁺-лимфоцитарной реакции была практически одинаковой (33 и 37% соответственно). Это свидетельствует о различной инфильтрации паренхимы и стромы опухоли Т- и НК-клеточными популяциями.

Методом ПЦ исследование субпопуляций интратуморальных лимфоцитов серозной аденокарциномы яичников проведено с применением тройной флуоресцентной метки. Периферические иммунокомпетентные клетки идентифицировали на основании выраженной экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45 (рис. 1).

Преобладание зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) среди интратуморальных иммунокомпетентных клеток (CD45⁺) серозной аденокарциномы яичников подтверждено методом ПЦ (62—92,6%). На рис. 2 представлен пример высокого содержания зрелых CD3⁺-Т-клеток в ткани серозной аденокарциномы яичников.

В 4 случаях в ткани опухоли преобладали Т-киллеры (CD3⁺CD8⁺) — 62—75% (рис. 3), в стольких же наблюдениях процентное содержание CD3⁺CD4⁻ и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов было равным, в 3 случаях преобладали CD4⁺CD3⁻ лимфоциты. Соотношение CD3⁺CD8⁺/CD3⁺CD4⁺ было > 2 лишь у 3 больных.

Рецептор интерлейкина-2 — ИЛ-2 (маркер CD25) присутствовал как на CD4⁺CD3⁺-, так и на CD8⁺CD3⁺-лимфоцитах (рис. 4). Пропорция CD25⁺CD4⁺CD3⁺-лимфоцитов среди интратуморальных CD3⁺-Т-клеток находилась в диапазоне от 0,8 до 32%, причем у 6 больных CD25⁺-клетки составляли 30—60% от CD4⁺CD3⁺-лимфоцитов (рис. 5).

Обсуждение

Появившиеся в последние годы публикации о влиянии на прогноз заболевания уровней интратуморальной Т-клеточной инфильтрации были посвящены РЯ в целом. Доминирующей нозологической формой среди злокачественных опухолей яичников является серозная аденокарцинома. По этой причине мы провели исследования в данной группе больных.

Наши результаты указывают на то, что субпопуляции интратуморальных лимфоцитов, инфильтрирующих паренхиму и строму опухоли,

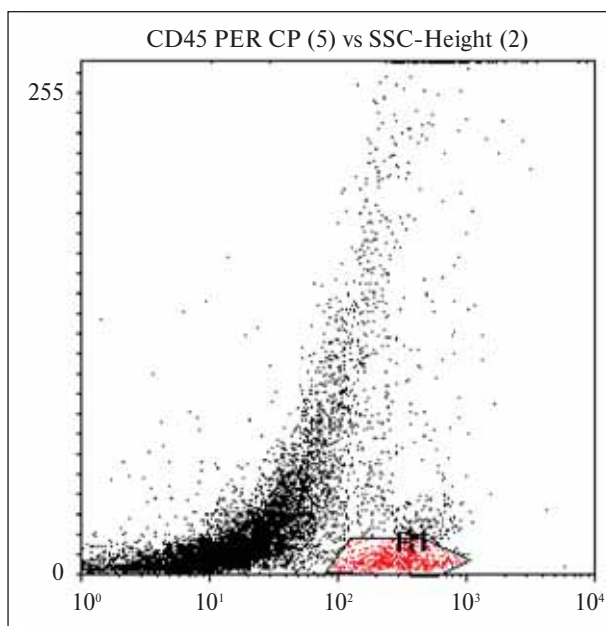


Рис. 1. Идентификация зрелых интратуморальных лимфоцитов на основании экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45. По оси абсцисс — уровни экспрессии, по оси ординат — характеристики светорассеяния клеток (SSC). R1 — гейт лимфоцитов

различаются. Это продемонстрировано ИГХ-исследованиями на свежемороженых (криостатных) срезах опухолевой ткани. Тumor-пенетрирующие иммунокомпетентные клетки были представлены в основном CD8⁺-лимфоцитами. Однако число клеток с экспрессией маркера зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) было значительно ниже, чем уровни Т-клеток с экспрессией обще-Т-клеточных маркеров CD5 и CD7. В сочетании с высоки-

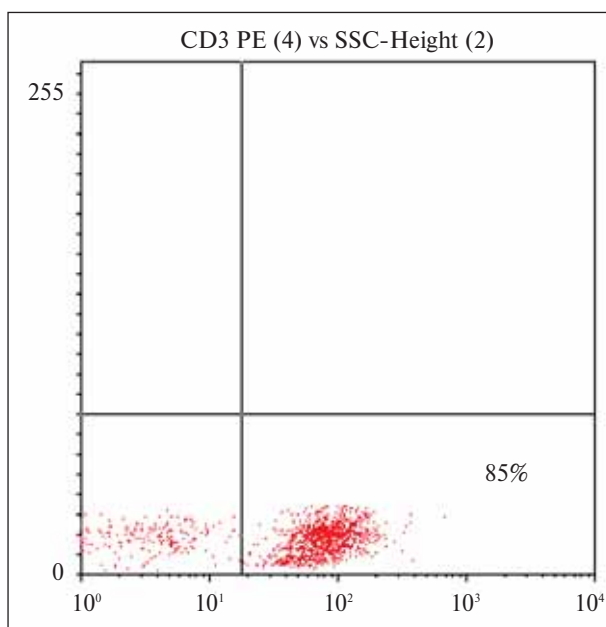


Рис. 2. Пример высокого содержания зрелых Т-лимфоцитов в гейте CD45⁺-клеток (CD45⁺, гейт R1, см. рис. 1). Т-клетки составляют 85% среди лимфоцитов

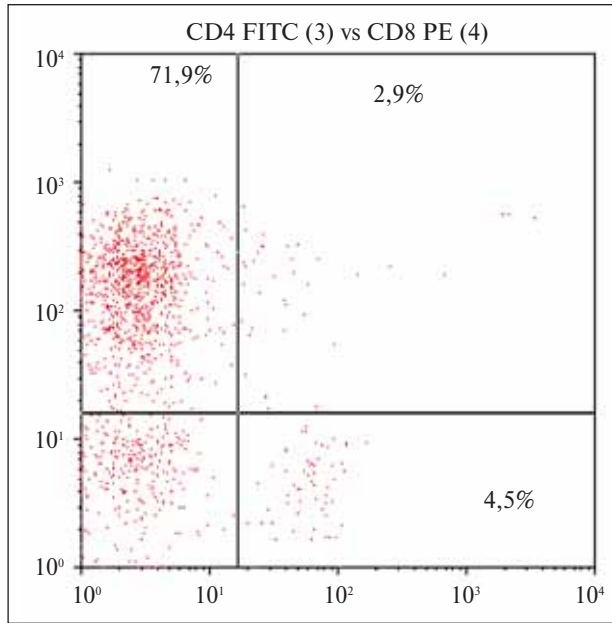


Рис. 3. Преобладание Т-киллерных (CD8⁺) лимфоцитов среди зрелых интратуморальных Т-клеток. Показано соотношение CD4- и CD8-лимфоцитов в гейте CD3⁺-лимфоцитов (см. рис. 2). Т-киллеры (CD3⁺CD8⁺) составляют 72% среди интратуморальных CD3-лимфоцитов

ми уровнями CD56⁺- и CD8⁺-лимфоцитов это свидетельствует о том, что среди ТПЛ в ткани серозной аденокарциномы яичников преобладали НК-клетки.

Напротив, стромальная инфильтрация опухоли была представлена преимущественно зрелыми Т-лимфоцитами (CD3⁺). Это подтверждено не только ИГХ-, но и ПЦ-исследованиями.

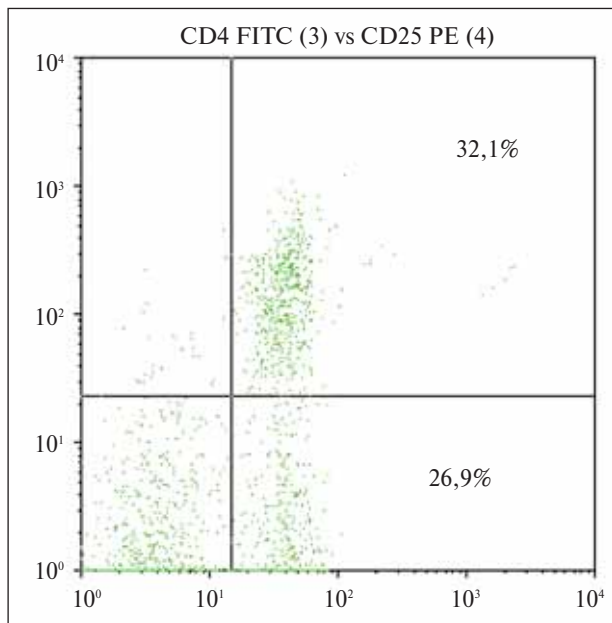


Рис. 4. Активационный антиген CD25 (рецептор ИЛ-2) присутствует на CD8⁺- и CD4⁺-интратуморальных лимфоцитах. Представлены данные в гейте CD3⁺-Т-клеток

Применение ПЦ возможно лишь при условии проведения исследования в суспензии клеток, после чего дальнейшее раздельное изучение эпителиального и стромального компонентов становится невозможным. Вместе с тем ПЦ позволяет изучать одновременно несколько маркеров на мембране одной клетки. Нами были изучены маркеры CD4, CD8, CD25 в пределах Т-клеток. Количественная оценка содержания Т-лимфоцитов проведена в гейте CD45⁺-лимфоцитов, присутствующих в ткани опухоли. Доминирующим типом интратуморальных лимфоцитов являются зрелые Т-клетки (CD3⁺). Это согласуется с данными, полученными нами при ИГХ-исследовании стромальных лимфоцитов, которые являются доминирующим (в сравнении с ТПЛ) типом интратуморальных иммунокомпетентных клеток.

Высокое соотношение CD8⁺/CD4⁺ (> 2, что, по данным зарубежных авторов [8], коррелирует с благоприятным прогнозом) отмечено лишь у 3 больных, и для анализа клинической значимости полученных иммунологических данных потребуются дополнительные исследования.

Наши результаты указывают на то, что CD25⁺-клетки составляют значительную пропорцию среди CD4⁺CD3⁺-лимфоцитов. Это может служить указанием на наличие в опухолевой ткани выраженной пропорции Т-регуляторных клеток. Данный факт, однако, нуждается в дополнительной верификации на основании специфического маркера Т-регуляторов — FOXP3.

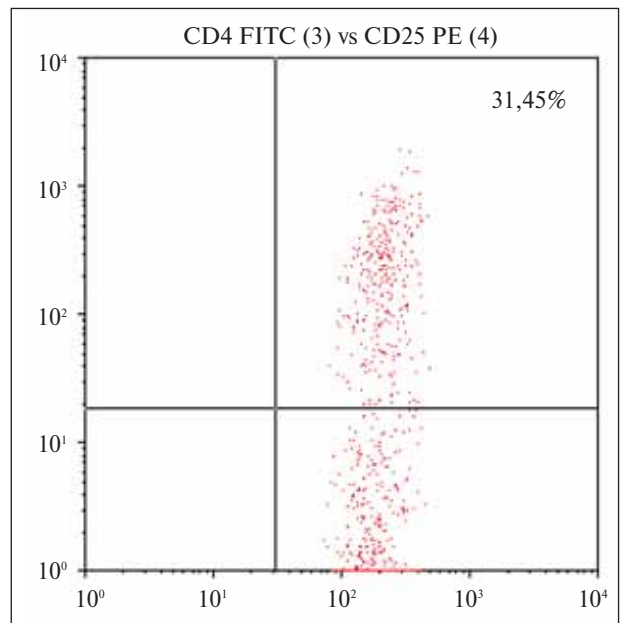


Рис. 5. Высокое содержание CD25⁺CD4⁺-лимфоцитов, доля CD25⁺-клеток среди CD3⁺-CD4⁺-лимфоцитов — 31,45%

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2005 г. Вестн РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2007;18(2):прил. 1.
2. Жордания К.И., Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Опухоли яичников. В кн.: Клиническая онкогинекология. Под ред. В.П. Козаченко М., 2005. с. 220—69.
3. Tupitsyn N.N., Kadagidze Z.G., Tuichev I.K. Relationship between semi-quantitative and quantitative parameters of local immune response in gastric cancer. *Exper Oncol* 1995;17(1):31—6.
4. Никулин М.П., Овсянников С.В., Тупицын Н.Н. Иммунофенотипическая гетерогенность рака желудка: 15-летний опыт исследований. *Иммунол гемопоз* 2004;(1):133—44.
5. Naito Y., Saito K., Shiiba K. et al. CD8⁺ T Cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:3491—4.
6. Schumacher K., Haensch W., Roefzaad C., Schlag P.M. Prognostic significance of activated CD8⁺ T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:3932—6.
7. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы. *Иммунол гемопоз* 2009;(1):8—51.
8. Sato E., Olson S.H., Ahn J. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cells ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *PNAS* 2005;102(51):18538—43.
9. Zang L., Conero-Garcia J.R., Katsaros D. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348(3):203—13.
10. Matsushita N., Ghazizadeh M., Konishi H., Araki T. Association of ovarian tumor epithelium coexpressing HLA-DR and CA-125 antigens with tumor infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *J Nippon Med Sch* 2003;70(1):40—4.
11. Hatanishi J., Mandai M., Iwasaki M. et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3360—5.
12. Tomsova M., Melichar B., Sedlakova I., Steiner I. Prognostic significance of CD3⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2008;108(2):415—20.
13. Clarke B., Tinker A.V., Lee C.H. et al. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod Pathol* 2009;22(3):393—402.
14. Curiel T.J., Coukos G., Zou L. et al. *Nat Med* 2004;10:942.

**НЕПОСРЕДСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ХИРУРГИЧЕСКОГО
ВМЕШАТЕЛЬСТВА ПОСЛЕ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ
С СЕЛЕКТИВНОЙ ХИМИОЭМБОЛИЗАЦИЕЙ МАТОЧНЫХ АРТЕРИЙ
У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНО НЕРЕЗЕКТАБЕЛЬНЫМ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ**

И.А. Косенко, Э.А. Жаврид, О.П. Матылевич, Т.М. Литвинова, В.С. Дударев

РНИЦ им. Н.Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь

**SHORT-TERM RESULTS OF SURGICAL INTERVENTION AFTER NEOADJUVANT
MULTIDRUG CHEMOTHERAPY WITH SELECTIVE CHEMOEMBOLIZATION
OF UTERINE ARTERIES IN PATIENTS WITH INITIALLY UNRESECTABLE CERVIX UTERI CANCER**

I.A. Kosenko, E.A. Zhavrid, O.P. Matylevich, T.M. Litvinova, V.S. Dudarev

N.N. Alexandrov Republican Research-and-Practical Center of Oncology and Medical Radiology, Minsk, Republic of Belarus

Due to the poor outcomes of treatment for locally advanced cervix uteri cancer (CUC), new multimodality treatment modes have been recently sought for this patient population, by using neoadjuvant multidrug chemotherapy (MDCT) prior to surgical intervention. Many investigators are inclined to consider this approach to be an alternative to the standard treatment, although a number of issues, among them optimal combination of chemical drugs, are not settled yet.

This study has evaluated the short-term results of MDCT with selective chemoembolization of uterine arteries with gemcitabine in 22 CUC patients treated at the N.N. Alexandrov Republican Research-and-Practical Center of Oncology and Medical Radiology in 2007-2009. MDCT courses have been noted to be satisfactorily tolerated, without causing severe adverse reactions. Neoadjuvant treatments have provided tumor resectability in 90.9% of the patients, the radicability index being 85%.

Key words: *cervix uteri cancer, angiography, neoadjuvant chemotherapy, selective chemoembolization of uterine arteries*

Введение

В 90-е годы в онкогинекологическом отделении НИИ онкологии и медрдиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь был разработан способ химиолучевой терапии, включающий неoadъювантную химиотерапию (НАХТ) 5-фторурацилом в дозе 2 г/м² (48-часовая инфузия) и цисплатином в дозе 100 мг/м² (24-часовая инфузия) [1]. После завершения НАХТ зарегистрирована объективная регрессия опухоли на 20—

45% от ее исходного объема, что улучшило или создало условия для последующего введения внутриполостной γ-терапии в план сочетанного лучевого метода [2]. Ближайшие результаты лечения у больных с размерами первичного очага в пределах Т3 увеличились на 20,8%, а отдаленные — на 14% по сравнению с таковыми при использовании только лучевой терапии (ЛТ) [2, 3].

Способность НАХТ уменьшить размеры первичной опухоли вплоть до ее резектабельности