

А.З. Айкян, В.І. Шинкевич, І.П. Кайдашев
Українська медична стоматологічна академія, Полтава

ХАРАКТЕРИСТИКА ІНФІЛЬТРАЦІЇ CD68⁺ ТА CD163⁺ МАКРОФАГАМИ ПЕРВИННОГО ВОГНИЩА ТА МЕТАСТАТИЧНИХ УРАЖЕНЬ РЕГІОНАРНИХ ЛІМФОВУЗЛІВ ПРИ ЛЮМІНАЛЬНИХ ІНВАЗИВНИХ КАРЦИНОМАХ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЇХ ІМУНОФЕНОТИПУ

E-mail: docaikart@gmail.com

М1 ПАМ мають важливу протипухлинну активність, здатні ліквідувати ракові клітини шляхом продукції сполук і виділяють хемокіни, які рекрутують і преміюють Т-клітини протипухлинного фенотипу, що призводить до затримки росту або регресії пухлини. М2-подібні ПАМ, навпаки, можуть активно сприяти кожному етапу розвитку та прогресування пухлини. Особливості локалізації ПАМ у відділах РМЗ, та їх щільність пов'язані з імуногістохімічними характеристиками пухлин, їх злоякісним фенотипом та прогнозом. Дослідження взаємозв'язків між патогістологічними, ІГХ характеристиками РМЗ та представництвом у них ПАМ є важливим для розуміння можливих локальних функцій та наслідків. В нашому дослідженні представлені кількісні характеристики і особливості локалізації CD68⁺ і CD163⁺ М2-подібних ПАМ, які інфільтрують гістохімічні підтипи люмінальних карцином (люмінальний А, люмінальний В HER2-негативний, та люмінальний В HER2-збагачений) МЗ у первинному вогнищі без метастазів і у парних зразках з метастазами у лімфовузлі у зв'язку з морфологічними та імунофенотипічними характеристиками РМЗ, для дослідження їх діагностичної і патогенетичної ролі.

Ключові слова: пухлинно-асоційовані макрофаги (ПАМ), імуногістохімічні дослідження (ІГХ), CD68+ПАМ і CD163+М2-подібні макрофаги, люмінальні карциноми молочної залози.

Дослідження є фрагментом НДР «Комплексне дослідження патогенетичної ролі субпопуляції М1 та М2 макрофагів в розвитку хронічного обструктивного захворювання легень для розробки та обґрунтування персоналізованої терапії з врахуванням маси тіла» (№ державної реєстрації 0117U005252).

Пухлинно-асоційовані макрофаги (ПАМ) є важливим прогностичним фактором і, як доведено, пов'язані з інвазією й міграцією різних видів раку. ПАМ розглядають як М1- і М2-подібні макрофаги. М1 ПАМ, мають важливу протипухлинну активність, здатні ліквідувати ракові клітини шляхом продукції активних форм кисню та реактивних азотистих проміжних сполук і виділяють хемокіни, які рекрутують і преміюють Т-клітини протипухлинного фенотипу при деяких видах раку, що призводить до затримки росту або регресії пухлини. М2-подібні ПАМ, навпаки, можуть активно сприяти кожному етапу розвитку та прогресування пухлини: проліферації ракових клітин, інвазії, метастазуванню та ангіогенезу, шляхом вивільнення цитокінів, факторів росту, ферментів, які розщеплюють позаклітинну матрицю, включаючи фактор росту ендотелію судин (VEGF), прокінетинин (Vn8) та матриксну металопротеїназу 9 (ММР9). Також, М2-подібні ПАМ пригнічують цитотоксичну активність Т-клітин шляхом секреції супресивних цитокінів, таких як ІL-10 і TGF-β, високим рівнем активності аргінази та ін. М2-подібні ПАМ сприяють рецидиву пухлини після опромінення та антиангіогенної терапії [6].

За даними нещодавнього метааналізу, особливості локалізації ПАМ у відділах РМЗ, та їх щільність пов'язані з імуногістохімічними (ІГХ) характеристиками пухлин, їх злоякісним фенотипом та прогнозом [12].

Як більшість інших пухлин, карцинома молочної залози (ГЗ) виявляє аномальний зразок генетичної експресії. Основними її факторами патогенезу є гени, пов'язані з рецепторами гормонів, кластерів HER2-генів та генів, асоційованих з проліферацією. Люмінальні підтипи демонструють експресію генів, пов'язаних з естрогенними рецепторами (ER), і мають кращий прогноз, ніж HER2-збагачені та базально-подібні підтипи, які зазвичай є ER-негативними. Що аргументує, певним чином, видокремлене дослідження підвидів, зокрема люмінальних.

Отже, дослідження взаємозв'язків між патогістологічними, ІГХ характеристиками РМЗ та представництвом у них ПАМ є важливим для розуміння можливих локальних функцій та наслідків.

Метою роботи було дослідити кількісні характеристики і особливості локалізації CD68⁺ і CD163⁺ М2-подібних ПАМ, які інфільтрують гістохімічні підтипи люмінальних карцином ГЗ у первинному вогнищі без метастазів і у парних зразках з метастазами у лімфовузлі у зв'язку з морфологічними та імунофенотипічними характеристиками РМЗ, для дослідження їх діагностичної і патогенетичної ролі.

Матеріал та методи дослідження. Біоптати та клінічні дані були отримані від пацієнтів, які проходили лікування в Полтавському обласному клінічному диспансері. Дослідження було

схвалено комісією з етики УМСА. Матеріалом дослідження були інтраопераційні тканини пухлин та імпілатеральних лімфовузлів при радикальному видаленні молочних залоз. Середній вік – 58 років, від 30 до 79. Імуногістохімічні характеристики видалених пухлин (HER2, ER, PR, Ki67) використовували для виділення групи люмінальних зразків. Морфологічні та ІГХ заключення були отримані згідно критеріїв визначення молекулярно-біологічного підтипу (діагностично-консультативний центр CSD Health care, м. Київ)

Імуногістохімічні дослідження для визначення ПАМ і М2-подібних макрофагів проводили за допомогою стрептавідин-пероксидазного методу. Парафінові зрізи товщиною 5 мкм, отримані за стандартною технікою автоматизованого циклу патолого-анатомічної лабораторії, депарафінували, дегідратували, відновлювали антигени у цитратному буфері (pH 6,0) у мікрохвильовій печі, блокували ендogenous пероксидазу реактивом з набору PolyVue HRP/DAB Detection System (For Mouse & Rabbit Primary Antibodies, Diagnostic BioSystems, USA). Після чого зрізи інкубували при температурі 4°C протягом ночі з мишиними моноклональними антитілами анти-CD68 (клон PG-M1, REF PD M065-S, Diagnostic BioSystems, USA) і анти-CD163 (клон 10D6, REF Mob460-01. За даними метааналізу [12] використання CD68 як біомаркера ПАМ для ІГХ оцінки має пріоритети, порівняно з окремим визначенням CD163 або CD206. Далі зрізи обробляли у два кроки Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB Detection System (Diagnostic BioSystems, USA), детекторною системою з візуалізацією реакції хромогеном ДАБ, дозобарвлювали ядра гематоксилином Майєра і заключали під покрівне скло у кедровий бальзам. Для негативного контролю використовували буфер розведення антитіл. Тканини лімфовузлів використовували як позитивний контроль визначення макрофагів.

Оцінку імуногістохімічного забарвлення проводили шляхом підрахунку CD68+ПАМ і CD163+М2-подібних ПАМ під світловим мікроскопом (Біолам, ЛОМО, Росія: об'єктив ×40, окуляр ×7) не менше ніж у 5-ти полях зору інтенсивної ІГХ-реакції кожного зрізу, обчислюючи середньоарифметичне, в межах пухлинних гнізд та стромі. У підрахунок включали імунопозитивні клітини з морфологією макрофагів. Мікрофотографії отримували за допомогою мікроскопу Leica DM500, Leica, Германия, (об'єктив ×40).

Статистичний аналіз проводили за допомогою програми GraphPad Prism з використанням непараметричної кореляції, лінійної регресії, та аналізу Манна-Уїтні.

Результати дослідження та їх обговорення. Біопсійний матеріал було розподілено на три групи за клінічними ІГХ-характеристиками: перша – люмінальний А, друга – люмінальний В HER2-негативний, третя – люмінальний В HER2-збагачений; по дві підгрупи у кожній: N0 та N1, по 3 біоптата. Всього 18 зразків. Дослідження організоване як пілотне для перевірки гіпотези про особливості ПАМ відповідно до різновидів РМЗ. Зв'язки між рівнями ІГХ-реакції на ER, PR, Ki67 статистично перевірені на повному масиві зразків (без розподілу на підгрупи). При гістологічному описі зразки оцінювали за морфотипом інвазивного росту, G-ступенем (1-3), характеристикою стромі (фіброзна, десмопластична, жирова (при інвазії в жирову тканину) та рихла васкуляризована), рівнем лімфоїдної інфільтрації (високий, помірний, слабкий); наявності некротичних осередків (так/ні); ознаки лімфоваскулярної інвазії (пухлинні емболи) (так/ні). Далі підсумовували спільні риси підгруп РМЗ, з окремими проводили кореляційний аналіз (на цілому масиві) з кількісними показниками CD68+ПАМ і CD163+М2-подібних макрофагів.

CD68 – маркерний протеїн ПАМ і є загальним для всіх макрофагів маркер, який широко використовують як прогностичний при багатьох пухлинах [9]. У дослідженні маркер використано з метою виявлення загальної популяції ПАМ. CD163+ ПАМ охарактеризовані як «маркер пропухлинних макрофагів». У дослідженні його використано для ідентифікації М2-подібних макрофагів.

Рівні інфільтрації пухлини ПАМ умовно розподілено на три категорії: низький (до 10 клітин на поле зору), помірний (10-15 клітин) та високий (>15). Локалізацію клітин враховували: у стромі, гніздах, осередках некрозу, периферичних відділах інвазії у жирову тканину; солокалізацію CD163+М2-подібних з CD68+ПАМ – за тими ж критеріями, для виявлення спільних для підгруп/груп особливостей. Узагальнені результати наведені у вигляді таблиць 1-3 для кожної з трьох груп.

Люмінальний А (ER+/HER2-) є найбільш поширеним люмінальним підтипом і становить приблизно 40-70% усіх випадків РГЗ. Висока експресія ER+ у поєднанні з відсутністю HER2(-), визначала люмінальне А походження зразків (табл. 1). Гістологічними рисами підгрупи були належність до інвазивної протокової карциноми з високим та помірним (G1-2) ступенем диференціювання, наявність фіброзної та масивної десмопластичної стромі. Але спостерігався різні морфологічні особливості пухлин і різний рівень лімфоїдної інфільтрації.

Морфологія і характеристики ПАМ при люмінальному А РМЗ (перша група)

Патогістологічний опис						Характеристики ПАМ		
Люмінальний AN0(ER+ PR+/- HER2- Ki67+/-), перша підгрупа								
Морфо тип, ІГХ-характеристика зразку пухлини	G	Строма	Лімфо-їдна інфільтрація	Осередки некрозу	Лімфо-васкул. інвазія	Щільність CD68+ПАМ/CD163+M2	Локалізація ПАМ	
1	2	3	4	5	6	7	8	
ІПКа ацинарн, солід та криброзн буд ER-100% PR-100% Ki67-20%	2	Фібозна, фібозно-жирова, ділянки десмопластичної	Висока	+	-	16,5 висока/ 7,4-низька	Осередки у стромі, жировій, та на фоні пухлинних гнізд	
Муциозна ІПКа ER-100% PR-0 Ki67 -10%	1		Низька	-	-	8,8 низька/ 4,3 низька	≈Рівномірно, у стромі та гніздах (рис.)	
ІПКа з лобулярним зразком росту ER-100% PR-100% Ki67-10%	2		Висока	-	-	14,1 помірн/ 4,9 низька	Скупчення в стромі, жировій (рис.)	
Люмінальний А N1(ER+ PR+ HER2- Ki67-), друга підгрупа						7	8	9
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ІПКа солідної будови ER-98% PR-91% Ki67-26%	2	Фібозна, жирова, десмопластична	Помірна	-	-	9,2 низька/ 2,9 низька	≈Рівномірно	Скупчення в стромі (10-15), поодинокі на фоні гнізд
ІЛКа ER-100% PR-100% Ki67-1%	1	Фібозна, десмопластична	Помірна	+	-	23,1 висока/ 1,7 низька	≈Рівномірно, здебільшого у стромі, в ділянках некрозу	Скупчення в стромі та жировій; поодинокі у гніздах та некротичних ділянках
ІПКа солідної будови ER-100% PR-100% Ki67-5%	2	Десмопластична, масивна	Помірна	+	-	8 низька/ 4,7 низька	Нерівномірно, скупчення в стромі, в ділянках некрозу	Скупчення в масивній стромі (до 40 клітин) та ділянках некрозу, поодинокі в гніздах

Примітка. Тут і далі: ІПКа – інвазивна протокова карцинома, ІЛКа – інвазивна лобулярна карцинома; «+» - так; «-» - ні.

CD68+ПАМ розміщувалися по-різному, але у стромі їх присутність була більш регулярна (рис. 1 А), ніж у пухлинних гніздах (відмічається більша чи менша площа гнізд, незайманих ПАМ) (рис. 2 Б).

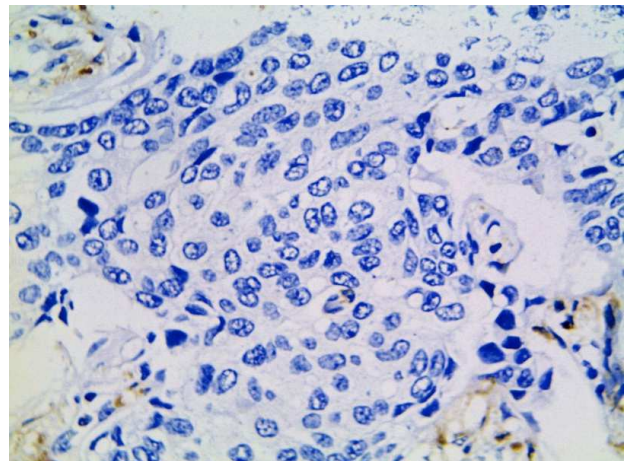
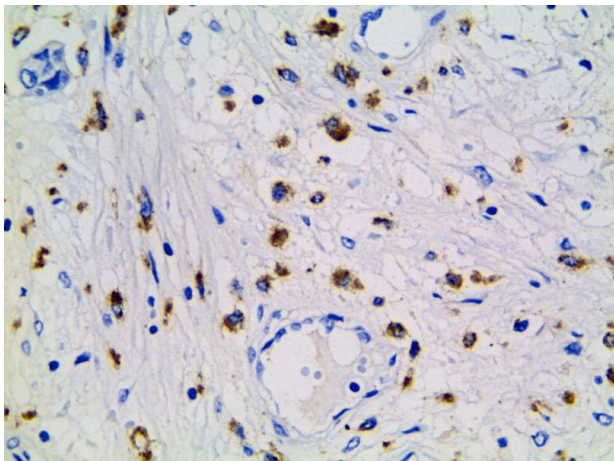


Рис. 1. Імуногістохімічне виявлення ПАМ (CD68+) у біоптаті РМЗ (ER+ PR+ HER2- Ki67-; G2; N1). Високе представництво ПАМ у стромі (А). Гнізда пухлини без ПАМ (Б). Об. ×40.

CD163+M2-подібні клітини не точно повторювали локалізацію загальної фракції макрофагів, співпадаючи у периферичних жирових і десмопластичних відділах стромі (рис. 2) та в деяких гніздах (у меншій кількості), та утворюючи другу лінію інфільтрації у стромі, на відстані від гнізд (табл. 1).

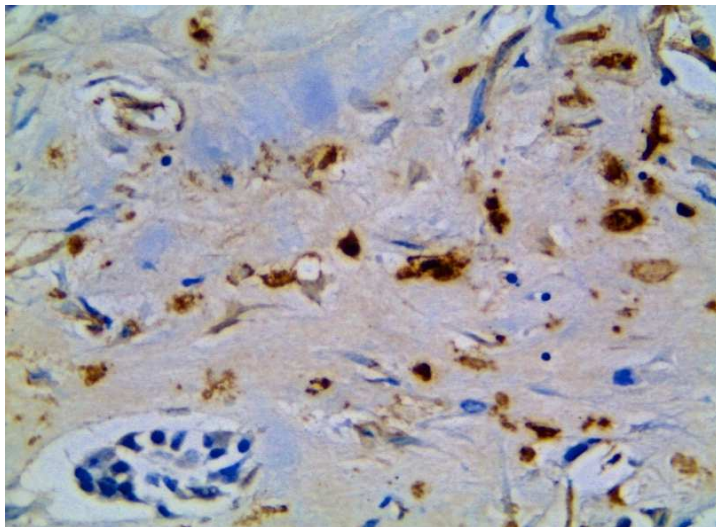


Рис. 2. Імуногістохімічне виявлення M2 (CD163+) у біопатії PM3. M2 у вигляді скупчень зосереджені в десмопластичній стромі. Контрастування: гематоксилін Майєра, об.×40.

У ділянках некрозу чи навколо них, де зазвичай виявляється висока присутність CD68+ПAM, спостерігається солокалізація M2-клітин у меншій кількості.

При порівнянні люмінальних А підгруп за ознакою N0/N1 різких відмінностей не відзначено, хоча чисельність M2 при N0 була незначно вищою (7,4; 4,3; 4,9), порівняно з N1 (2,9; 1,7; 4,7), щоправда, це не досягало статистичної достовірності.

Спільні ознаки зразків у табл. 2 – знижена експресія PR, та підвищена Ki67 (або злегка підвищена HER2 – 30%), що відносить їх до люмінального В HER2-негативного підтипу. Гістологічні особливості полягали у представництві відділів тонкої рихлої стромі у частини зразків, без різниці за метастазуванням (взагалі морфологія пухлин не мала видатних особливостей у зв'язку з метастазами). Різноманітність морфології за рахунок феномену лобулярної канцеризації додатково підтримує розуміння, що термінальна протоково-лобулярна субоднина є джерелом походження багатьох внутріпротокових карцином.

При цьому клінічному типі, з боку CD68+ПAM відзначено рівномірний та нерівномірний їх розподіл, представництво у стромі і у гніздах. CD163+M2 на всіх зразках було дуже мало, а солокалізація з ПAM відмічена у стромі, в зоні некротизованих та, поодинокі, у гніздах (табл. 2). Отримані результати не співпадають із попередніми дослідженнями, де було показано, що більше число CD68+RS1+ Мф у мікрооточенні солідних структур асоційовано з підвищеним ризиком метастазування у лімфовузлі при люмінальному В HER2 – PM3. Пояснення полягає у малій кількості досліджених зразків, а також може свідчити, що індивідуальне значення рівнів інфільтрації пухлини макрофагами залишається невловимим.

Продукт HER2 гена експресований на високому рівні у 18-20% інвазивних карцином. На всіх зразках люмінального В HER2-збагаченого РГЗ (табл. 3), морфологічно, була представлена інвазивна протокова карцинома в її варіаціях, не залежно від метастазування. Зразки N0 обов'язково мали ділянки рихлої васкуляризованої стромі в окремих пухлинних комплексах. Особливість підгрупи N1 – ознаки лімфоваскулярної інвазії на всіх зразках.

CD68+ПAM не високому рівні, але регулярно були присутні у всіх відділах пухлин, хоча і нерівномірно: низький рівень інфільтрації на всіх зразках (4,6; 6; 5,6 та 8,2; 2,5; 4,3). CD163+M2 дещо збільшуються за кількістю за умов метастазування (0-1 при N0, і 3, 4; 1,7; 3 – при N1); розміщувалися тільки осередками: у стромі і некротизованих відділах, де їх чисельність часто практично співпадала з CD68+ПAM (можливо, ці ділянки інфільтровані виключно M2). У гніздах – поодинокі або відсутні.

Отже, морфологія люмінальних пухлин була дуже різноманітна, навіть в межах клінічно розсортованих вузьких ІГХ-підгруп.

Відносно винятковими морфо-характеристиками вирізнялися зразки люмінального В HER2-збагаченого PM3: при N1 виявлялися ознаки лімфоваскулярної інвазії. Хоча, згідно морфологічних досліджень, ці ознаки притаманні мікропапілярній карциномі ГЗ, яка складає 1.5-2.5%, а за іншими джерелами - 6% від інвазивних карцином [2]. Кілька досліджень припускають, що макрофаги сприяють інтравазації, ключовому крокові метастатичного поширення пухлинних клітин [5]. У відношенні до цього, саме CD163+M2 дещо збільшувалися за кількістю при люмінальних В HER2+ інвазивних карциномах за умов метастазування (0-1 клітина на поле зору при N0, і 3,4; 1,7; 3 – при N1 (табл. 3), (хоча ця кількість не перевищувала M2, наприклад, при люмінальному А N1 (2,9; 1,7; 4,7; табл. 1).

Відмінності в рівнях інфільтрації і CD68+, і CD163+ ПАМ вцілому люмінальних РМЗ, в залежності від метастазування у лімфовузли, виявилися статистично недостовірними (дані не наводили), однак, більший розмір вибірки необхідний для поглибленого висновку.

Таблиця 2

Морфологія і характеристики ПАМ при люмінальному Б HER2-негативному РМЗ

Патогістологічний опис						Характеристики ПАМ	
Люмінальний В HER – N0 (ER+ PR+ HER2– Ki67+/-)							
Морфо тип, ІГХ-характеристика зразку пухлини	G	Строма	Лімфоїдна інфільтрація	Осередки некрозу	Лімфоваскул. інвазія	Щільність CD68+ПАМ/CD163+M2	Локалізація ПАМ
1	2	3	4	5	6	7	8
ППКа з лобулярним зразком росту ER-90% PR-60% Ki67-40%	2	Рихла васкуляризована і фіброзна	Низька	-	-	5,5 низька/1 низька	≈ Рівномірно
ППКа ацинарно-солідної будови з елементами лобулярного росту ER-100% PR-80% Ki67-30%	2	Фіброзна, фіброзно-жирова	Висока	+	+	16,6 висока/1 низька	Осередки у стромі, некротичних ділянках, жировій
ППКа ацинарної та солідної будови Ki67– ER-100% PR-100% Ki67-0% HER2-30%	2		Помірна	+	-	16,9 висока/1 низька	Осередки у стромі, навколо некротичної ділянки, у жировій, рідко на фоні гнізд
Люмінальний В HER – N1 (ER+ PR+ HER2– Ki67+)							
1	2	3	4	5	6	7	8
ППКа солідної будови ER-100% PR-100% Ki67-30%	2	Рихла, фіброзна й рубцева	Помірна	+	-	6,7 низька/1 низька	≈ Рівномірно у стромі, жировій, некротичних ділянках, поодинокі в гніздах
ППКа солідної будови з лобулярним (кільцеклітинним) зразком інвазивного росту ER-100% PR-80% Ki67-40%	2	Фіброзна, фіброзно-жирова й рубцева у центрі	Низька	-	-	4,3 низька/1 низька	≈ Рівномірно у стромі, жировій, поодинокі в гніздах
ППКа трабекулярної будови ER-100% PR-15% Ki67-40%	3	Рихла і невелика діяка десмопластичної	Низька	-	-	8 низька/1 низька	≈ Рівномірно у стромі та гніздах

Кількісні показники CD68+ПАМ виявилися меншими (табл. 1-3), порівняно з даними авторів [11] – 61,14±23,76/на поле зору великого збільшення, на 100 випадків РГЗ. Що може пояснюватися тим, що автори не сортували клінічні зразки пухлин на ІГХ-підтипи. Також, відносно невисокі кількісні показники CD68+ПАМ і CD163+M2, отримані у власному дослідженні, узгоджуються з даними метааналізу, що висока інфільтрація ПАМ достовірно асоційована з негативним статусом по рецепторам гормонів [12]. А також із даними, що CD163+M2-макрофаги достовірно асоційовані з ER-негативними низькодиференційованими протоковими карциномами МЗ [10]. Відповідно, позитивний ER-статус (люмінальні пухлини у власному дослідженні) може бути пов'язаний з меншими рівнями інфільтрації ПАМ.

Типова локалізація CD68+ПАМ проявлялася у регулярній присутності у стромі на всіх зразках, часом з утворенням зосереджень та/або маленьких скупчень. Також, ці клітини розміщувалися у самих гніздах пухлин, або примикали до них, що спостерігалось із різною частотою на різних зразках (це залежало і від загальної чисельності), при цьому завжди відмічалася певна площа гнізд/або пухлинних комплексів, незайманих ПАМ. Також, типово CD68+ПАМ

зосереджувалися у зонах некрозу чи навколо них. Відповідно, солокалізацію CD163+ ми відмічали в периферичних жирових і десмопластичних відділах строми та в деяких гніздах (у меншій кількості), у вигляді другої лінії інфільтрації у стромі (на відстані від гнізд). Переконливий тематичний огляд [5] відображає що по-різному активовані ПАМ постійно знаходяться у різних за оксигенацією регіонах пухлин. На моделі аденокарциноми M3 показано що МНС- P^{low} ПАМ, які експресують M2-асоційовані маркери (а саме IL-4R α , стабілін-1, CD204 і CD206) виявлені у гіпоксичних відділах (а саме некротичні і бідно васкуляризовані ділянками), у той час як МНС- P^{high} ПАМ, з M1-подібним фенотипом, знаходяться у відділах з нормальним рівнем кисню.

Таблиця 3

Морфологія і характеристики ПАМ при люмінальному Б HER2-збагаченому РМЗ

Патогістологічний опис						Характеристики ПАМ	
Люмінальний В HER+ N0 (ER+/знижений PR+/знижений HER2+ Ki67+/-)							
Морфо тип пухлини	G	Строма	Лімфоїдна інфільтрація	Осередки некрозу	Лімфоваскул. інвазія	Щільність CD68+ПАМ/CD163+M2	Локалізація ПАМ
1	2	3	4	5	6	7	8
ППКа солідно-альвеолярної будови ER-80% PR-80% Ki67-15% HER2 – 70%	2	Переважає фіброзна, є рихла	Помірна	+	-	4,6 низька/ 1 низька і осередки (8-10)	≈Рівномірно
ППКа колоїдної будови ER-50% PR-50% Ki67-0% HER2 – 100%	2	Фіброзна, десмопластична, є рихла	Виразна	+	-	6 низька/ 1 низька і осередки (5)	Скупчення у стромі, некротичних ділянках, жировій Поодинокі у гніздах
ППКа ацинарно-солідної будови ER-100% PR-100% Ki67-0% HER2 – 100%	2	Рихла та фіброзна	Виразна	-	-	5,6 низька/ 1 низька і осередки (6)	Кілька скупчень у стромі, побіля гнізд
Люмінальний Б HER+ N1							
1	2	3	4	5	6	7	8
ППКа альвеолярної будови ER-40% PR-5% Ki67-30% HER2 – 40%	2	Фіброзна, жирова та десмопластична	Виразна	+	+	8,5 низька/ 3,4 низька	Зосередження у жировій та некротичних ділянках
ППКа трабекулярної морфології ER-100% PR-20% Ki67-0% HER2 – 90%	3	Фіброзна і десмопластична	Виразна	+	+	2,5 низька/ 1,7 низька	Зосередження у некротичних ділянках та жировій тканині
ППКа трабекулярної морфології ER-100% PR-100% Ki67-0% HER2 – 100%	3	Десмопластична	Виразна	+	+	4,3 низька/ 3 низька	≈Рівномірно у стромі і прилягають до гнізд

У власному дослідженні кореляційний аналіз між наявністю/відсутністю некрозів і кількістю ПАМ в люмінальному РМЗ не показав достовірних зв'язків (дані не наводили).

У зв'язку з широко відомими функціями макрофагів *in vivo*, а це 4 базових функції, а саме, відбір зразків, загоєння, знищення/пригнічення патогенів та презентація антигенів [8], локалізація CD163+M2-подібних ПАМ у щільній волокнистій десмопластичній стромі зрозуміла як реалізація «загоєння». За рахунок відбору зразків, макрофаги регулярно отримують (від власного організму) сигнали, які інструктують їх відновлювати або замінювати втрачені чи зношені клітини й міжклітинні матриці – функція яка передбачає M2-поляризацію. Це також узгоджується з їх локалізацією у ділянках некрозів. Не виключено, що надмірне відкладення/утворення строми може

попросту захищати пухлину від імунного нагляду і погіршувати проникнення ліків, як це відбувається наприклад при протоковій карциномі підшлункової залози [7].

Щодо локалізації CD68+ і CD163+ ПАМ у гніздах пухлин, то перше пояснення – там локалізувалися некротизовані або дистрофічні пухлинні клітини, по-друге це прояв функції антипухлинного захисту M1-клітинами [8]. Так чи інакше, але фагоцитоз макрофагами некротизованих (а можливо і живих), пухлинних клітин відбувається, що підтверджено морфологічно. Невирішене питання – які наслідки цього фагоцитозу, враховуючи четверту функцію макрофага – презентацію антигенів.

Всі досліджені зразки характеризувалися низьким рівнем інфільтрації CD163+M2-подібними макрофагами (табл. 1-3), однак саме їм були притаманні певні особливості в залежності від підгрупи. По-перше, при люмінальному А чисельність M2 підгрупи N0 була дещо вищою (7,4; 4,3; 4,9), порівняно з N1 (2,9; 1,7; 4,7). По-друге, при люмінальному В HER2+ M2, навпаки, збільшувалися за умов метастазування (0-1 при N0, і 3,4; 1,7; 3 – при N1). Друга особливість як раз співпадає із загальним розумінням M2 як пропухлинних макрофагів [3]. На моделі карциноми молочної залози у мишей показано, що саме M2-макрофаги були джерелом продукції епідермального фактора росту (EGF) і були здатні до активація сигналізації через EGF-рецептор на пухлинних клітинах [4]. Отже, експресія HER2 пухлиною і присутність M2 можуть знаходитися у прямій залежності. З наведеними даними узгоджується і третя особливість: при люмінальному В HER2- РГЗ на всіх зразках, не залежно від підгрупи N0/1, зустрічалися поодинокі CD163+M2 макрофаги. Отже, окрім HER2 і M2, є й інші фактори, які сприяють метастазуванню.

Таблиця 4

Зв'язки між G-ступенем, ПГХ-характеристиками зразків РМЗ і кількісними показниками CD68+ПАМ, CD163+M2: результати окремих лінійних регресійних аналізів; β -коефіцієнт (95% конфіденційний інтервал)

ПАМ G	Середня кількість CD68+ПАМ	Середня кількість CD163+M2 (у Log-трансформованих одиницях)
G-ступінь	-4,99 (-9,887 до 0,104)*	0,247 (-0,825 до 0,344)
Рівень експресії ER (у нормалізованих одиницях)	0,039 (-0,059 до 0,137)	0,001 (-0,005 до 0,006)
Рівень експресії PR (у нормалізованих одиницях)	0,052 (-0,024 до 0,128)	9,684e-005 (-0,004 до 0,005)
Рівень експресії Ki67 (у нормалізованих одиницях)	-0,047 (-0,240 до 0,145)	-0,005 (-0,015 до 0,005)

Примітка – трансформацію перемінних проводили з метою нормалізації цифрових даних.

Стосовно взаємозв'язків між патоморфологічними окремими ознаками і ПАМ: кореляційний аналіз виявив зворотно-пропорційний зв'язок між G-ступенем пухлини і кількістю CD68+ПАМ, але не CD163+M2-подібних макрофагів (табл. 4). Результати лінійної регресії можна трактувати, що зміни кількісних характеристик ПАМ на 23% пояснюється G-ступенем, або при збільшенні G на одиницю, кількість ПАМ знижується на $5 \pm 2,3$ ($p=0,046$). Кореляційний аналіз між рівнями експресії ER, PR, Ki67 пухлинами і кількісними показниками CD68+ПАМ, CD163+M2-подібних макрофагів не показав достовірності (табл. 4).

Висновки

1. Позитивний ER-статус досліджених зразків люмінальних РМЗ може бути пов'язаний з відносно меншим рівнем їх інфільтрації ПАМ.

2. Відмінності в рівнях інфільтрації і CD68+, і CD163+ ПАМ люмінальних РМЗ, в залежності від метастазування у лімфовузлі, виявилися статистично недостовірними, що потребує збільшення статистичної вибірки. Різноманітні зміни чисельності макрофагів, що інфільтрують люмінальні підвиди РМЗ, в залежності від метастазування, також можуть пояснювати недостовірність цих змін.

3. Типова локалізація CD68+ПАМ у зразках люмінальних РМЗ виявлена: у стромі, пухлинних гніздах, зонах некрозу та/або навколо них; з утворенням зосереджень та/або скупчень. Регулярно відмічалася певна площа пухлинних комплексів, незайманих ПАМ. Солокалізацію CD163+M2 відмічено в периферичних жирових і десмопластичних відділах пухлинної стромы та в деяких гніздах (у меншій кількості).

4. Виявлено достовірний зворотній зв'язок між G-ступенем люмінальних РМЗ і рівнем інфільтрації CD68+ПАМ.

5. При РМЗ не виключена реалізація ПАМ звичайних функцій М1/М2 макрофагів: фагоцитозу пухлинних (у т.ч. некротизованих) клітин (зниженого внаслідок особливостей пухлинних клітин) та надмірного утворення строми, що може додатково захищати пухлину від імунного нагляду.

Список літератури

1. Zavyalova MV, Telegina NS, Vtorushin SV, Perelmuter VM, Slonimskaya YeM, Denisov YeV, Cherdyntseva NV, Patalyak SV. Osobennosti morfologicheskogo stroeniya lyuminalnogo A tipa raka molochnoy zhelezy. Sibirskiy onkologicheskii zhurnal. 2013; 1(55). [in Russian]
2. Allison, K. H.; Molecular Pathology of Breast Cancer - What a Pathologist Needs to Know. Am J Clin Pathol 2012; 138:770-780.
3. Dama Laoui, Eva Van Overmeire, Patrick De Baetselier, Jo A. Van Ginderachter, Geert Raes. Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. Front Immunol. 2014; 5: 489.
4. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, et al. CD4⁺ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. Cancer cell. 2009;16(2):91-102.
5. Kim IS, Zhang XH-F. One microenvironment does not fit all: heterogeneity beyond cancer cells. Cancer metastasis reviews. 2016;35(4):601-629.
6. Laoui D, Van Overmeire E, De Baetselier P, Van Ginderachter JA, Raes G. Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. Frontiers in Immunology. 2014; 5:489.
7. Long KB, Gladney WL, Tooker GM, Graham K, Fraietta JA, Beatty GL. Cooperate to Redirect Tumor-Infiltrating Monocytes to Degrade Fibrosis and Enhance Chemotherapy Efficacy in Pancreatic Carcinoma. 2016 Apr; 6(4):400-413.
8. Mills CD, Thomas AC, Lenz LL, Munder M. Macrophage: SHIP of Immunity. Frontiers in Immunology. 2014; 5:620.
9. Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:2796-801.
10. Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. 2015 Aug 5; 17:101.
11. Yang J, Li X, Liu X, Liu Y. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2015; 8(6):6656-6664.
12. Zhao X, Qu J, Sun Y, Wang J, Liu X, Wang F, Zhang H, Wang W, Ma X, Gao X, Zhang S. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. 2017 May 2; 8(18):30576-30586.

Реферати

ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФИЛЬТРАЦИИ CD68⁺ И CD163⁺ МАКРОФАГАМИ ПЕРВИЧНОГО ОЧАГА И МЕТАСТАТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ РЕГИОНАРНЫХ ЛИМФОУЗЛОВ ПРИ ЛЮМИНАЛЬНЫХ ИНВАЗИВНЫХ КАРЦИНОМАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ИММУНОФЕНОТИПА
Айкян А.З., Шинкевич В.І., Кайдашев І.П.

М1 ПАМ обладают важной противоопухолевой активностью, способны ликвидировать раковые клетки путем продукции соединений и выделяют хемокины, которые рекрутируют и премируют Т-клетки противоопухолевого фенотипа, что приводит к задержке роста или регрессии опухоли. М2-подобные ПАМ, наоборот, могут активно способствовать каждому этапу развития и прогрессирования опухоли. Особенности локализации ПАМ в отделах РМЖ, и их плотность связаны с иммуногистохимическими характеристиками опухолей, их злокачественным фенотипом и прогнозом. Исследование взаимосвязей между патогистологическими, ИГХ характеристиками РМЖ и представительством в них ПАМ является важным для понимания возможных локальных функций и последствий. В нашем исследовании представлены количественные характеристики и особенности локализации CD68 + и CD163 + М2-подобных ПАМ, которые инфильтрируют гистохимические подтипы люминальных карцином (люминальный А, люминальный В HER2-отрицательный, и люминальный В HER2-обогащенный) МЖ в первичном очаге без метастазов и в парных образцах с метастазами в лимфоузлы в связи с морфологическими и иммунофенотипическими характеристиками РМЖ, для исследования их диагностической и патогенетической роли.

Ключевые слова: опухлеассоциированные макрофаги (ПАМ), иммуногистохимическое исследования (ИГХ), CD68 + ПАМ и CD163 + М2-образные макрофаги, люминальные карциномы молочной железы.

Стаття надійшла 10.06.18 р.

CHARACTERISTICS OF CD68 + AND CD163 + INFILTRATION WITH MACROPHAGES OF THE PRIMARY FOCUS AND METASTATIC INJURIES OF REGIONAL LYMPH NODES IN LUMINAL INVASIVE CARCINOMAS OF THE MAMMARY GLAND DEPENDING ON THEIR IMMUNOPHENOTYPE
Aykyan A.Z., Shynkevych V.I., Kaidashev I.P.

M1 TAM have important antitumor activity, they are able to eliminate cancer cells by producing compounds and secrete chemokines that recruit and reward T cells of the antitumor phenotype, which leads to growth inhibition or regression of the tumor. M2-like TAM, on the opposite, can actively contribute to each stage of tumor development and progression. Features of TAM localization in the departments of the breast cancer, and their density are associated with the immunohistochemical characteristics of tumors, their malignant phenotype and prognosis. The study of the correlations between histopathological, IHC characteristics of breast cancer and the TAM represented in them is important for understanding the possible local functions and consequences. Our study present quantitative characteristics and localization features of CD68 + and CD163 + M2-like TAM, which infiltrate histochemical subtypes of MG luminal carcinomas (luminal A, luminal B HER2-negative, and luminal B HER2-enriched) in the primary focus without metastases and in the paired samples with metastases into the lymph nodes due to the morphological and immunophenotypic characteristics of breast cancer, to study their diagnostic and pathogenetic role.

Key words: tumor-associated macrophages (TAM), immunohistochemical (IHC) studies, CD68 + TAM and CD163 + M2-shaped macrophages, luminal carcinomas of the mammary gland.

Рецензент Старченко І. І.: