

DOI 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-313-319

УДК 618.19-006.04/.44:611.018

Айкян А. З., Кайдашев І. П.

КІЛЬКІСНА ХАРАКТЕРИСТИКА CD68+ ТА CD163+ МАКРОФАГІВ В ПЕРВИННОМУ ВОГНИЩІ ТА В МЕТАСТАТИЧНИХ УРАЖЕННЯХ РЕГІОНАРНИХ ЛІМФОВУЗЛІВ ПРИ ПОТРІЙНО-НЕГАТИВНІЙ ІНВАЗИВНІЙ КАРЦИНОМІ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

Українська медична стоматологічна академія (м. Полтава)

docaikart@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота являється фрагментом науково-дослідної роботи НДІ ГОРПФ «Комплексне дослідження патогенетичної ролі субпопуляцій M1 та M2 макрофагів в розвитку хронічного обструктивного захворювання легень для розробки та обґрунтування персоналізованої терапії з врахуванням маси тіла» (№ державної реєстрації 0117U005252).

Вступ. Тричі-негативна підгрупа раку грудної залози (ТНРГЗ) (естроген-, прогестерон- і HER2-рецептор негативний) часто вражає молодших жінок і звичайно має гірший прогноз, порівняно з іншими типами РГЗ. Нещодавно, комплексна роль імунної системи у рості, елімінації і метастазуванні постала як об'єкт підвищеної уваги, обіцяючи забезпечити клінічними прогностичними маркерами прогресування, а також мішенями для терапії широкого спектру пухлин, у т.ч. і ТНРГЗ. Недавній огляд [1] показав, що не дивлячись на інтенсивне вивчення лейкоцитів, які інфільтрують пухлину, та їх підгруп (CD8 + і регуляторних Т-клітин), жоден з цих показників не пристосований до рутинної клінічної практики, хоча ТНРГЗ відрізняється від інших типів РГЗ, зокрема, клітинним складом імунного інфільтрату з прогностичною достовірністю.

При РГЗ і у цілому, і при ТНРГЗ зокрема, пухлина-асоційовані макрофаги (ПАМ) головним чином пов'язані із гіршим прогнозом, але їх склад, очевидно, різниться між індивідуальними ТНРГЗ [1].

Отже, дослідження ПАМ при ТНРГЗ є актуальними, тому **метою роботи** стало дослідження кількісних показників, особливостей локалізації CD68+ і CD163+M2-подібних ПАМ, які інфільтрують ТНРГЗ у первинному вогнищі без метастазів і у парних зразках з метастазами у лімфовузлі, а також патоморфологічних характеристик цього типу РГЗ для встановлення їх внеску у метастазування.

Об'єкт і 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 іпілатеральних лімфовузлів при радикальному видаленні молочних залоз без неоад'ювантного лікування.

Імуногістохімічні (ІГХ) характеристики видалених пухлин (HER2, ER, PR, Кі67) використовували для виділення групи ТНРГЗ.

За даними метааналізу [2] використання CD68 як біомаркеру ПАМ для ІГХ оцінки має пріоритети, порівняно з окремим визначенням CD163 або CD206.

Проаналізовано 2 підгрупи ТНРГЗ, врівноважених за N0/1 статусом, по 3 зразки у кожній, і відповідно 3 зразки метастазів у лімфовузлі. Середній вік пацієнтко становив 64 роки, від 52 до 76. Первинно-метастатичний РГЗ спостерігався у всіх пацієнтко 2ї, N1 групи. Морфологічні та ІГХ заключення були отримані згідно критеріїв визначення молекулярно-біологічного підтипу.

ІГХ дослідження по визначенню ПАМ і M2-подібних макрофагів проводили за допомогою стрептавідин-пероксидазного методу. Парафінові зрізи, товщиною 5 мкм, отримані за стандартною технікою автоматизованого циклу патолого-анатомічної лабораторії, депарафінували, дегідрували, відновлювали антигени у цитратному буфері (pH 6,0) у мікроволновій печі (при потужності ≈600 Вт, 3 цикли по 7 хв. з перервою 1 хв.), охолоджували 20 хв., відмивали у дистиводі та фосфатно-сольовому буфері (ФСБ, pH 7,2-7,4) по 2 хв., блокували ендogenous пероксидазу реактивом з набору PolyVue HRP/DAB Detection System (For Mouse & Rabbit Primary Antibodies, Diagnostic BioSystems, USA), відмивали у ФСБ, 3 хв. 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, у розведенні 1:100 у буфері для розведення антитіл для ІГХ-методики (Antibody Diluent, Dako, USA). Далі зрізи обробляли у два кроки Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB Detection System (Diagnostic BioSystems, USA), детекторною системою з візуалізацією реакції хромогеном ДАБ, дозabarвлювали ядра гематоксилином Майєра і заключали під покрівне скло у кедровий бальзам. Буфер Antibody Diluent замість первинних антитіл використовували як негативний контроль, тканини лімфовузлів – як позитивний.

Оцінку імуногістохімічного забарвлення проводили шляхом підрахунку CD68+ПАМ і CD163+M2-подібних ПАМ під світловим мікроскопом (Біолам, ЛОМО, Росія: об'єктив ×40, окуляр ×7) у 7-10-ти полях зору інтенсивної ІГХ-реакції кожного зрізу, обчислюючи середньоарифметичне, в межах пухлинних гнізд та пухлинної строми. У підрахунок включали імуно-позитивні клітини з морфологією макрофагів. Мікрофотографії отримували за допомогою мікроскопу Leica DM500, Leica, Німеччина, (об'єктив ×4, 40).

Статистичний аналіз проводили за допомогою програми GraphPad Prism 5 з використанням непараметричних, параметричних і симуляційних методів.

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження організоване як описове патоморфо-

Кількісні характеристики пухлинно-асоційованих макрофагів при тричі-негативному раку грудної залози (середня кількість на поле зору великого збільшення)

Перша група, N0		Друга група, N1		Метастази у лімфовузлах	
CD68+ПAM	CD163+M2	CD68+ПAM	CD163M2	CD68+ПAM	CD163+M2
12,5	5,1	23,5	5,1	24,6	17,0
11,4	6,0	22,3	5,1	9,4	6,8
12,5	1,0	26,6	6,4	19,0	9,5

логічне порівняння між двома групами: N0 та N1, тричі-негативного РГЗ, порівняння кількісних характеристик CD68+ і CD163+M2-подібної фракції ПAM, а також для перевірки можливих кореляційних відносин між кількісними характеристиками макрофагів у первинній пухлині та у відповідному метастазі в іпсилатеральні пахвові лімфовузли.

CD68 – маркерний протеїн ПAM, і є загальним для всіх макрофагів маркер, який широко використовують як прогностичний при багатьох пухлинах [3]. У дослідженні його використано з метою виявлення загальної популяції ПAM у біоптатах РГЗ та метастатичних лімфовузлів. CD163 вважається маркером пропухлинних M2-подібних макрофагів [4], відповідно його теж було використано.

Кількісні показники двох груп та метастазів подано у **табл. 1**.

Патоморфологічна характеристика першої групи. Групу склали зразок інвазивної протокової карциноми ГЗ переважно трабекулярної будови, та 2 зразки – солідної будови, які різнилися між собою G2-3 ступенями диференціювання, перший зразок мав ознаки лімфоваскулярної інвазії, третій зразок характеризувався надзвичайно маленькими пухлинними гніздами, які нагадують численні емболи, як при запальному РГЗ. Дещо спільними описовими характеристиками для зразків, окрім ER– PR– HER2–, була строма з масивними фібротичними змінами, часом з крововиливами, ознаками некрозу у тій чи іншій мірі, та виразною лімфоплазмоцитарною інфільтрацією.

CD68+ПAM щільно і різко нерівномірно розподілялися на препаратах всіх зразків, утворювали власні осередки у стромі, гніздах, та ділянках некрозу, де набували незвичайної зливної та/або вакуолізованої форми (**рис. 1**). Особливий вигляд імунопозитивних ПAM може відображати їх надзвичайну активність. У стромальних відділах ПAM мали переважно видовжену форму.

CD163+M2-подібних макрофагів на препаратах було помітно менше ніж CD68+ (**рис. 2**). Відзначена їх регулярна локалізація у фіброзній стромі, навколо гнізд серед лімфоїдного інфільтрату, у пухлинних гніздах та вогнищах некрозу.

Отже, CD163+M2 наближено повторювали чисельність CD68+ПAM у фіброзній стромі, а у гніздах і некротичних ділянках були присутні у меншій кількості, особливо на третьому препараті, де їх кількість обчислена як поодинокі (0-1) на поле зору.

Патоморфологічна характеристика другої групи. Групу склали 3 зразки інвазивних протокових карцином солідної і солідно-альвеолярної морфології, і 3 зразки відповідних метастазів у регіональні, іпсилатеральні, лімфовузли. Зразки описані як ГЗ

ступеню диференціювання, морфологічно та ІГХ однорідні (ER– PR– HER2– Ki67+) з обов'язковою присутністю осередків некрозу, фіброзною та фіброзно-жировою строною і щільною лімфоїдною інфільтрацією.

На всіх препаратах відзначено високу щільність інфільтрації CD68+ПAM (**рис. 3**), які розміщувалися нерівномірно та утворювали скупчення у вигляді незвичайних крупних зливних форм у гніздах, на межі з жировою тканиною, та в осередках некрозу. CD163+M2 макрофаги було помітно менше, співлокалізувалися з CD68+ПAM переважно у стромі (**рис. 4**) й осередках некрозу.

Патоморфологічна характеристика метастазів у лімфовузлах. Метастази були представлені великими округлими світлими атиповими ядрами, ніжною або помірно розвиненою строною, яку із різною щільністю інфільтрували лімфоцити. 2 з 3х зразків мали частково гістологічно збережену тканину лімфовузлів. На всіх препаратах зареєстровані ознаки некрозу.

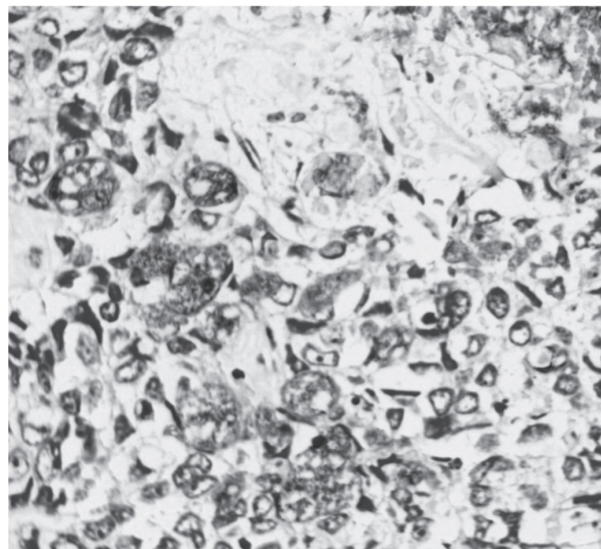


Рис. 1. Імуногістохімічне виявлення ПAM (CD68+) у біоптаті ТНРГЗ N0. ПAM надзвичайної зливної форми з вакуолізацією (1) серед кластеру пухлинних клітин поблизу некротичної ділянки (2). Контрастування гематоксилін Майєра, об.х40.

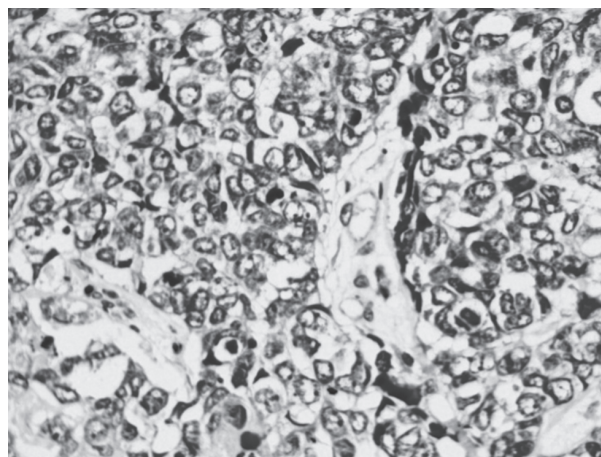


Рис. 2. Імуногістохімічне виявлення M2 (CD163+) у біоптаті ТНРГЗ N0. Клітини розміщені у стромі (стрілки). Контрастування гематоксилін Майєра, об.х40.

CD68+ ПАМ щільно і нерівномірно інфільтрували метастази. Зосереджувалися у стромі і в межах численних, некротично-змінених гнізд. Найщільніші зосередження відмічені у зонах некрозу, на межі з лімфатичною тканиною, або в синусах уздовж яких просувається пухлинний ріст.

CD163+ M2 розміщувалися у стромі і гніздах, маючи видовжену форму, приблизно рівномірно, на помітно нижчому рівні, та, на третьому препараті, нерівномірно, досягаючи в скупченнях – у зонах некрозу, – тих самих кількісних показників, що і CD68+ ПАМ.

Отже, патоморфологія метастазів відрізнялася від первинного вогнища РГЗ і між собою, спільною ознакою була обов'язкова присутність ділянок некрозу в метастазах. ПАМ по різному інфільтрували метастази, рівень CD163+ M2 орієнтовно збільшувався у метастазах, порівняно з первинним вогнищем.

Статистична обробка середніх показників кількості CD68+ПАМ і CD163+M2-подібних макрофагів непараметричними методами (Манна-Уїтні – для незалежних і Вілкоксона, для парних перемінних) між двома групами, між кількостями макрофагів у первинному вогнищі і парних метастазах не показало достовірності. Також, непараметрична кореляція Спірмена не показала достовірних зв'язків між кількостями макрофагів у первинних вогнищах і метастазах. Тож для нівелювання малої кількості пацієнтів у групах, наступним кроком ми провели порівняння всієї сукупності цифрових результатів, підрахованих по кожному полю зору високого розрешення (від 7 до 10 на препарат). Встановлено достовірне збільшення кількості CD68+ПАМ та CD163+M2 в осередку РГЗ у групі з метастазами, зменшення CD68+ПАМ у метастазах, порівняно з первинним вогнищем та зворотні кореляційні відношення між CD163+M2 в первинних вогнищах і метастазах (табл. 2).

Наступним кроком ми вдалися до емпіричної оцінки через серію комп'ютерних симуляцій, які забезпечують наближення до справжнього розподілу, який лежить в основі статистики. Результати підтвердили достовірність попередніх результатів (обчислення даних з усіх полів зору, табл. 2), а також додали достовірності у збільшення чисельності CD163+M2 у метастазах, порівняно з первинним РГЗ, й перетворили зворотній кореляційний зв'язок між кількісними показниками CD163+M2 у первинних РГЗ та метастазах, на прямий (табл. 3).

Нами використано підхід дослідження у малих групах хворих вузького профілю, маючи за мету максимально персоналізувати результати у межах ІГХ підтипу РГЗ – тричі-негативному РГЗ. Індивідуальне тлумачення результатів дослідження є актуальним і сучасним питанням, особливо в онкології. Крім того, склад підтипів макрофагів, як припускається, відрізняється при ТНРГЗ від інших РГЗ. Стюарт та ін. (2012) показали, що базально-подібні клітини РГЗ мають більшу здатність, ніж менш агресивний тип РГЗ, стимулювати диференціювання макрофагів у клітинних культурах та індуюють поляризацію фенотипів M1 та M2, створюючи популяцію макрофагів, відмінних від популяції, утвореної під впливом клітин РГЗ менш

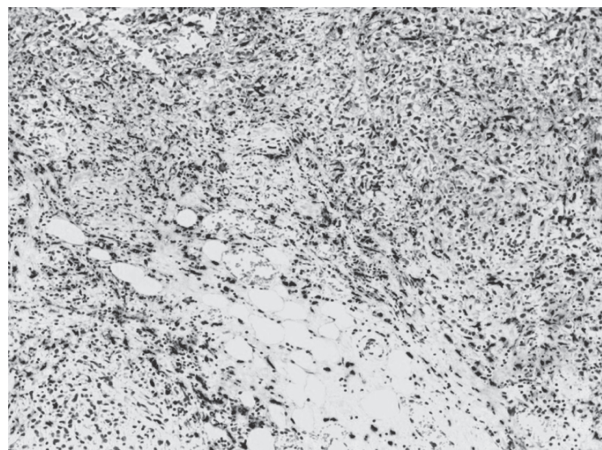


Рис. 3. Імуногістохімічне виявлення ПАМ (CD68+) у біопаті ТНРГЗ N1. Щільна інфільтрація CD68+ПАМ. Контрастування – гематоксилін Майєра, об.х4.

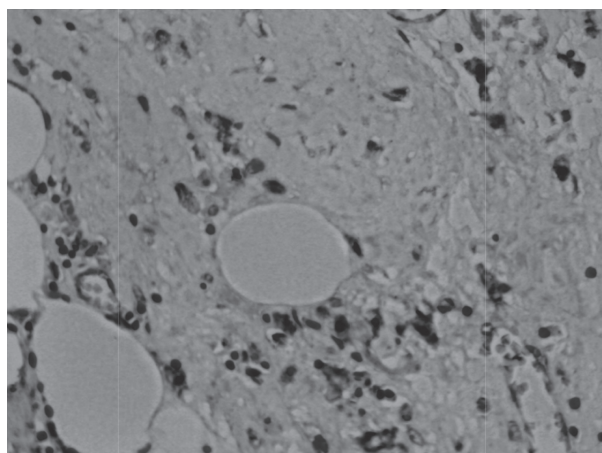


Рис. 4. Імуногістохімічне виявлення M2 (CD163+) у біопаті ТНРГЗ N1. M2 округлої форми з розгалуженнями цитоплазми (стрілки), розміщені у стромі. Контрастування – гематоксилін Майєра, об.х40.

агресивного типу [5]. Тому важливо аналізувати цей ІГХ-тип РГЗ окремо.

В обговоренні і підсумках ми базувалися на результатах статобробки первинних результатів з кожного поля зору, які підтвердили емпіричною оцінкою статистичного моделювання. При ТНРГЗ ми встановили достовірне збільшення кількості CD68+ПАМ та CD163+M2 в біоптатах РГЗ за умов метастазування у регіональні лімфовузли, що узгоджується з результа-

Таблиця 2.

Підсумки статистичної обробки повного цифрового масиву результатів дослідження

Показники які порівнюють	Результат та достовірність	Статистичний метод
CD68+ПАМ у межах РГЗ групи N1 порівняно з групою N0	Збільшення*, p<0,0001	Манна-Уїтні
CD163+M2 у межах РГЗ групи N1 порівняно з групою N0	Збільшення*, p<0,0005	
CD68+ПАМ у метастазах, порівняно з первинними РГЗ	Зменшення*, p=0,0473	Парний метод Вілкоксона
CD163+M2 у метастазах, порівняно з первинними РГЗ	Недостовірні зміни, p=0,2961	
Кореляція між кількостями CD68+ПАМ у первинних РГЗ і метастазах	Недостовірна, p=0,375, r=0,204	Кореляція Спірмена
Кореляція між кількостями CD163+ПАМ у первинних РГЗ і метастазах	Зворотна*, помірна, p=0,0024, r=-0,627	

Результати емпіричної оцінки статистично-симульованих даних

Показники які порівнюють	Достовірність	Статистичний метод	Сила ефекту (95% довірчий інтервал)
CD68+ПАМ РГЗ групи N1 порівняно з N0	Збільшення*, p<0,0001	Т-тест	-12,4 – (-11,59)
CD163+M2 РГЗ групи N1 порівняно з N0	Збільшення*, p<0,0001		-2,21 – (-1,24)
CD68+ПАМ у метастазах, порівняно з первинними вогнищами РГЗ	Зменшення*, p<0,0001	Парний Т-тест	5,328 – 7,916
CD163+M2 у метастазах, порівняно з первинними вогнищами РГЗ	Збільшення*, p<0,0001		-6,517 – (-4,516)
Кореляція між кількостями CD68+ПАМ у первинних вогнищах РГЗ і метастазах	Недостовірна, p=0,086, r=0,17	Кореляція Пірсона	-0,03 – 0,36
Кореляція між кількостями CD163+ПАМ у РГЗ і метастазах	Достовірна*, пряма, слабка, p=0,019, r=0,23		0,039 – 0,412

тами досліджень цього напрямку із більшим числом учасників, і підтверджує роль ПАМ, зокрема їх підрозділу – M2-подібних макрофагів, як сприятливих для розвитку пухлини [6]. Несприятливий прогноз при ТНРГЗ пов'язаний з високою щільністю інфільтрації ПАМ [7], та з вищим ризиком дистантних метастазів [8]. Отже, всі разом ці дані підтверджують, що підвищення чисельності CD68+ПАМ, як мінімум за рахунок CD163+M2-фракції, сприяє метастазуванню ТНРГЗ.

Аналіз локалізації визначив поєднане розміщення CD68+ПАМ і CD163+M2 у фіброзній стромі і некротичних ділянках. Відповідно, у гніздах розміщувалися переважно M1-подібні ПАМ. У першій групі, N0, схоже, саме ці клітини утворювали власні осередки у гніздах (враховуючи, що на одному із зразків CD163+M2 були лише поодинокі), і набували зливної та/або вакуолізованої форми (рис. 1), що може відображати їх фагоцитарну активність. Аналогічна картина відмічена і при N1 ТНРГЗ, у 2й групі. Контакт пухлинних клітин з макрофагами сприяє інвазії: як показано, ці клітини мігрують разом, уздовж волокон матриксу, і інтравазують також разом, що доводить поєднання ендотеліоцита, макрофага і пухлинної клітини [9]. Підхід функціональної морфології дозволяє припустити, що саме M1-подібні ПАМ найбільше контактують з пухлинними гніздами, що ми вважаємо передумовами просування, або метастазування пухлини у первинному вогнищі, хоча у якості прогностичного, їх значення ще необхідно прояснити.

Лімфатичні метастази можуть бути переважним способом поширення для РГЗ, а лімфатичні шляхи є не лише пасивними магістралями, але і полегшують активний відбір пухлинних клітин до місцевих та дистальних лімфатичних вузлів за допомогою сигналізації CCL21-CCR7; сприяють виживанню метастазуючих ракових стовбурних клітин за рахунок сигналізації CXCL12-CXCR4, та змінюють запальну відповідь господаря, яка порушує імунний нагляд за пухлиною [10]. Порівняно з первинним вогнищем, у відповідних метастазах ми виявили достовірні зменшення кількісних показників CD68+ПАМ, та кореляційні співвідношення кількостей CD163+M2. Інші автори встановили, що у лімфовузлах з метастазами РГЗ взагалі чисельність ПАМ знижується, порівняно з парни-

Таблиця 3.

ми лімфовузлами без метастазів, що може підтверджувати взаємозв'язок кількісних характеристик ПАМ з метастазуванням, але припускає іншу роль ПАМ у самих метастазах [11]. В основі кореляції може лежати сумісна міграція пухлинних клітин і макрофагів [9].

У лімфовузлах з метастазами ми відзначили досить точну, у т.ч. і в кількісному відношенні, співлокалізацію CD68+ПАМ і CD163+M2 у зонах некрозу. В інших відділах масивного представництва CD68+ПАМ: пухлинній стромі, гніздах, та на межі із залишками лімфатичної тканини, CD163+M2 було різко менше. Це означає, по периферії метастазу зосереджуються

M1-подібні макрофаги, вони ж переважають у стромі і гніздах, а в некротичних ділянках – баланс зміщений в бік M2-подібних. Не виключено, що в лімфовузлах функція M1 ПАМ (фагоцитоз та антигенпрезентація) пригнічені, цьому не заперечує їх кількісне зменшення порівняно з первинним вогнищем і припущення інших авторів [11]. Серед виявлених нами CD163+M2-подібних макрофагів у метастазах можливо домінували проангіогенні TIE2⁺/CD31⁺ макрофаги, як це дослідили [12], з пропухлинним потенціалом. Всі разом, ці дані вкладаються у загальноприйнятну думку, що M1 ПАМ мають антипухлинний потенціал, а M2 – пропухлинний, що ми спостерігали у метастатичних лімфовузлах.

Патоморфологічно, зразки РГЗ мали свої унікальні особливості такі як протяжність стромы, щільність представництва у ній резидентних непухлинних та інфільтруючих клітин, а також деякі риси морфології пухлинних клітин, які не обчислювали кількісно, внаслідок обмеженого числа учасниць дослідження. Достовірні відмінності перерахованих патоморфологічних характеристик досліджувалися і раніше [13]. Спільні описові характеристики включали десмопластичну реакцію, виразну запальну реакцію (у вигляді щільної лімфоцитозитарної інфільтрації) та ознаки некрозу у тій чи іншій мірі. Також, всі зразки метастазів характеризувалися обов'язковою присутністю ділянок некрозу. Нещодавній імпозантний огляд літератури розглядає масову інфільтрацію та вловлювання ПАМ у гіпоксичні/некротичні області пухлин, через ряд хемокінів (CCL2, CCL5, VEGF, CSF-1, семафорин 3A (SEMA3A), ендотелін, еотаксин та онкостатин M), з наступними пропухлинними функціями через фактор транскрипції HIF1a, який викликає експресію великого набору генів, пов'язаних з ангіогенезом, такими як VEGF [14], що передбачає M2-подібну поляризацію. З іншого боку, експериментальне дослідження карциноми легень на моделі у мишей по збільшенню оксигенації пухлини, не змінювало у ній ні кількості, ні співвідношення M1/M2, але специфічно знижувало експресію генів, чутливих до гіпоксії та ангіогенну активність M2 ПАМ (MHC-II (I_o)). [15]. Це пояснює наші знахідки при описі локалізації CD68+ПАМ і співлокалізації з ними CD163+M2-

подібних макрофагів у гістологічно-візуалізованих зонах некрозу, де прослідковується присутність і M1, і M2-подібних ПАМ.

Одне з головних спостережень дослідження – частина гнізд/пухлинних комплексів у первинних вогнищах ТНРГЗ і метастазах були інфільтровані скупченнями тільки CD68+ПАМ (які не повторювали CD163+M2) а отже були M1-подібними макрофагами (рис. 1), разом із збільшенням чисельності обох фракцій макрофагів при метастазах, це може свідчити що саме із збільшенням не тільки M2, але і M1 макрофагів пов'язані первинно пропухлинні ефекти.

Отримані результати не надають точні кількісні діагностичні або прогностичні показники ПАМ M1- чи M2 типу для використання у клінічній практиці, хоча їх значення і кількісні коливання достовірні, але доповнюють відомості щодо патогенетичного внеску. Недавні дослідження із створенням комп'ютерної обчислювальної моделі ТНРГЗ [16] продемонстрували, що відносно мала кількість макрофагів (щоправда без розподілу на M1/M2) посилює ріст пухлини [17,18], а велика – може навіть гальмувати. Ці дані додатково ставлять запитання про кількісні характеристики субтипів ПАМ вцілому при РГЗ.

Висновки

1. Підвищення рівня інфільтрації первинного вогнища ТНРГЗ CD68+ПАМ та CD163+M2-подібними макрофагами достовірно пов'язане з метастазуванням. Припускається, що саме M1-подібна субпопуляція

ПАМ найбільше контактує з пухлинними гніздами при ТНРГЗ, що може бути передумовами поширення пухлини, або метастазування.

2. Із збільшенням не тільки M2, але і M1 макрофагів можуть бути пов'язані первинно прометастатичні ефекти ТНРГЗ.

3. У метастатичних лімфовузлах кількість CD68+ПАМ була достовірно менше, порівняно з первинним ТНРГЗ, а кількісні показники CD163+M2 корелювали. Разом з локалізацією і співлокалізацією CD68+ і CD163+M2-подібних ПАМ, отримані результати вкладаються у загальноприйнятну парадигму, що M1 ПАМ мають антипухлинний але знижений потенціал, а M2 – пропухлинний, але це показано для метастазів у регіональних лімфовузлах при первинно-метастатичному ТНРГЗ.

4. Точні кількісні показники ПАМ для використання у клінічній практиці не розроблені, хоч їх патогенетичне значення і кількісні коливання достовірні відповідно до метастазування та інших клінічних даних ТНРГЗ.

Перспективи подальших досліджень. Розробити застосування в клінічній практиці кількісних показників ПАМ як показник прогнозу захворювання раку молочної залози.

Подяка. Автори висловлюють подяку к.б.н. Мамонтовій Т.В. за технічну допомогу в проведенні імуногістохімічного дослідження.

Література

1. Stovgaard ES, Nielsen D, Hogdall E, Balslev E. Triple negative breast cancer – prognostic role of immune-related factors: a systematic review. *Acta Oncol.* 2018 Jan;57(1):74-82. DOI: 10.1080/0284186X.2017.1400180. Epub 2017 Nov 23.
2. Zhao X, Qu J, Sun Y, Wang J, Liu X, Wang F, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget.* 2017 May 2;8(18):30576-86. DOI: 10.18632/oncotarget.15736
3. Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:2796-801. [PMC free article] [PubMed].
4. Yoshihiro Komohara, Koji Ohnishi. Possible functions of CD169-positive sinus macrophages in lymph nodes in anti-tumor immune responses. *Motohiro Takeya Cancer Sci.* 2017 Mar;108(3):290-5. Published online 2017 Mar 7. DOI: 10.1111/cas.13137
5. Stewart DA, Yang Y, Makowski L. Basal-like breast cancer cells induce phenotypic and genomic changes in macrophages. *Mol Cancer Res.* 2012;10:727-38.
6. Yang M, Li Z, Ren M, Li S, Zhang L, Zhang X, et al. Stromal Infiltration of Tumor-Associated Macrophages Conferring Poor Prognosis of Patients with Basal-Like Breast Carcinoma. *J Cancer.* 2018 Jun 6;9(13):2308-16. DOI: 10.7150/jca.25155. eCollection 2018.
7. Yang M, Ma B, Shao H, Clark AM, Wells A. Macrophage phenotypic subtypes diametrically regulate epithelial-mesenchymal plasticity in breast cancer cells. *MC Cancer.* 2016 Jul 7;16:419. DOI: 10.1186/s12885-016-2411-1.
8. Klingens TA, Chen Y, Aas H, Wik E, Akslen LA. Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer. *Hum Pathol.* 2017 Nov;69:72-80. DOI: 10.1016/j.humpath.2017.09.001. Epub 2017 Sep 18
9. Chen H, Chen X, Lin H. Expression of Tumor-Related Macrophages and Cytokines After Surgery of Triple-Negative Breast Cancer Patients and its Implications. *Wang J, Med Sci Monit.* 2016 Jan 11;22:115-20.
10. Yuan ZY, Luo RZ, Peng RJ, Wang SS, Xue C. High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *Onco Targets Ther.* 2014 Aug 21;7:1475-80. DOI: 10.2147/OTT.S61838. eCollection 2014
11. Harney AS, Arwert EN, Entenberg D, Wang Y, Guo P, Qian BZ, et al. Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA. *Cancer Discov.* 2015 Sep;5(9):932-43. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0012. Epub 2015 Aug 12.
12. Chitty JL, Filipe EC, Lucas MC, Herrmann D, Cox TR, Timpson P. Recent advances in understanding the complexities of metastasis. *F1000Research.* 2018;7:F1000 Faculty Rev-1169. DOI: 10.12688/f1000research.15064.1
13. Ju Yang, Xiaojing Li, Xiuping Liu, Yongjuan Liu. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):6656-64.
14. Kim O-H, Kang G-H, Noh H. Proangiogenic TIE2+/CD31+ Macrophages Are the Predominant Population of Tumor-Associated Macrophages Infiltrating Metastatic Lymph Nodes. *Molecules and Cells.* 2013;36(5):432-8. DOI: 10.1007/s10059-013-0194-7
15. Heba Sailem, Faraz K. Mardakheh, Mar Arias Garcia, Christopher J. Tape, Mitch Dowsett. A Histology-Genomic Integration Analysis Rachael Natrajan, Microenvironmental Heterogeneity Parallels Breast Cancer Progression. *PLoS Med.* 2016 Feb;13(2):e1001961. Published online 2016 Feb 16. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001961 PMCID: PMC4755617 PMID: 26881778
16. Aras S, Zaidi MR. TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *British Journal of Cancer.* 2017;117(11):1583-91. DOI: 10.1038/bjc.2017.356
17. Laoui D, Van Overmeire E, Di Conza G, Aldeni C, Keirsse J, Morias Y, et al. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res.* 2014 Jan 1;74(1):24-30. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1196. Epub 2013 Nov 12.
18. Norton KA, Jin K, Popel AS. Modeling trip, fibroblasts and tumor vasculature. *J Theor Biol.* 2018 Sep 7;452:56-68. DOI: 10.1016/j.jtbi.2018.05.003. Epub 2018 May 8.

КІЛЬКІСНА ХАРАКТЕРИСТИКА CD68+ ТА CD163+ МАКРОФАГІВ В ПЕРВИННОМУ ВОГНИЩІ ТА В МЕТАСТАТИЧНИХ УРАЖЕННЯХ РЕГІОНАРНИХ ЛІМФОВУЗЛІВ ПРИ ПОТРІЙНО-НЕГАТИВНІЙ ІНВАЗИВНІЙ КАРЦИНОМІ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ**Айкян А. З., Кайдашев І. П.**

Резюме. Особливості локалізації ПАМ у відділах РГЗ, та їх щільність пов'язані з імуністохімічними характеристиками пухлин, їх злоякісним фенотипом та прогнозом. Тричі-негативна підгрупа раку грудної залози (ТНРГЗ) часто вражає молодших жінок і звичайно має гірший прогноз, порівняно з іншими типами РГЗ. Наше дослідження організоване як описове патоморфологічне порівняння між двома групами: N0 та N1, тричі-негативного РГЗ, порівняння кількісних характеристик CD68+ і CD163+M2-подібної фракції ПАМ, а також для перевірки можливих кореляційних відносин між кількісними характеристиками макрофагів у первинній пухлині та у відповідному метастазі в іпсилатеральні пахвові лімфовузли. При ТНРГЗ ми встановили достовірне збільшення кількості CD68+ПАМ та CD163+M2 в біоптатах РГЗ за умов метастазування у регіональні лімфовузли, що узгоджується з результатами досліджень цього напрямку із більшим числом учасників, і підтверджує роль ПАМ, зокрема їх підрозділу – M2-подібних макрофагів, як сприятливих для розвитку пухлини. Неприятливий прогноз при ТНРГЗ пов'язаний з високою щільністю інфільтрації ПАМ, та з вищим ризиком дистантних метастазів. Отже, всі разом ці дані підтверджують, що підвищення чисельності CD68+ПАМ, як мінімум за рахунок CD163+M2-фракції, сприяє метастазуванню ТНРГЗ.

Ключові слова: пухлинно-асоційовані макрофаги, імуністохімічні дослідження, CD68+ і CD163+, тричі-негативна підгрупа, рак грудної залози.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА CD68+ И CD163+ МАКРОФАГОВ В ПЕРВИЧНОМ ОЧАГЕ И В МЕТАСТАТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ РЕГИОНАРНЫХ ЛИМФУОУЗЛОВ ПРИ ВТРОЙНЕ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**Айкян А. З., Кайдашев И. П.**

Резюме. Особенности локализации ПАМ в отделах РГЖ, и их плотность связанные с иммуногистохимическими характеристиками опухолей, их злокачественным фенотипом и прогнозом. Трижды-отрицательная подгруппа рака молочной железы (ТОРГЖ) часто поражает молодых женщин и обычно имеет худший прогноз по сравнению с другими типами РГЖ. Наше исследование организовано как описательное патоморфологическое сравнение между двумя группами: N0 и N1, трижды-негативного РГЖ, сравнение количественных характеристик CD68+ и CD163+ M2-образной фракции ПАМ, а также для проверки возможных корреляционных отношений между количественными характеристиками макрофагов в первичной опухоли и в соответствующем метастазе в ипсилатеральные подмышечные лимфоузлы. При ТОРГЖ мы установили достоверное увеличение количества CD68 + ПАМ и CD163 + M2 в биоптатах РГЖ в условиях метастазирования в региональные лимфоузлы, что согласуется с результатами исследований этого направления с большим числом участников, и подтверждает роль ПАМ, в частности их подразделения - M2-подобных макрофагов, как благоприятных для развития опухоли. Неблагоприятный прогноз при ТНРГЖ связан с высокой плотностью инфильтрации ПАМ, и с высоким риском дистантных метастазов. Итак, все вместе эти данные подтверждают, что увеличение численности CD68 + ПАМ, как минимум за счет CD163 + M2-фракции, способствует метастазированию ТНРГЗ.

Ключевые слова: опухоль-ассоциированные макрофаги, иммуногистохимические исследования, CD68+ и CD163+, трижды-отрицательная подгруппа, рак молочной железы.

QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF CD68+ AND CD163+ MACROPHAGES IN THE PRIMARY FOCUS AND IN METASTATIC LESIONS OF REGIONAL LYMPH NODES IN TRIPLE-NEGATIVE INVASIVE BREAST CARCINOMA**Aikian A. Z., Kaidashev I. P.**

Abstract. The triple-negative subgroup of breast cancer (TNBC) (estrogen, progesterone-, and HER2-receptor negatives) often affects young women and usually has a worse prognosis as compared to other types of BC. Recently, a complex role of the immune system in the growth, elimination and metastasis became an object of increased attention, promising to provide clinical prognostic markers of progression, as well as targets for the treatment of a wide range of tumors, including TNBC. In BC in general and in TNBC in particular, tumor-associated macrophages (TAM) are mainly associated with a worse prognosis, but their composition, apparently, varies between individual cases of TNBC. Thus, the research of TAM in TNBC is relevant, and therefore the aim of this study was to examine the quantitative parameters and features of localization of CD68+ and CD163+M2-like TAMs, which infiltrate TNBC in the primary focus without metastases and in paired samples with metastases in the lymph nodes, as well as the pathomorphological characteristics of this type of BC to determine their contribution to metastasis.

Biopsy samples and clinical data were obtained from patients undergoing treatment at Poltava Regional Clinical Dispensary. The study was approved by the Ethics Commission of Ukrainian Medical Stomatological Academy. Materials of the study were intraoperative tumor tissues and ipsilateral lymph nodes in radically removed mammary glands without neoadjuvant treatment. Immunohistochemical (IHC) characteristics of the removed tumors (HER2, ER, PR, Ki67) were used to distinguish the TNBC group. According to the meta-analysis, the use of CD68 as a biomarker for TAM for IHC evaluation has its priorities, as compared with the individual definition of CD163 or CD206. We analyzed two subgroups of TNBC, balanced by the N0/1 status, 3 samples in each, and 3 samples of metastases in the lymph nodes, respectively. The average age of patients was 64 years, from 52 to 76. Primary-metastatic BC was observed in all patients in the 2nd, N1 group. Morphological and IHC findings were obtained according to the criteria for determining the molecular and biological subtype. IHC studies for determining TAM and M2-like macrophages were performed using the streptavidin-peroxidase method. The evaluation of immunohistochemical coloring was

performed by counting CD68+TAM and CD163+M2-like TAMs under the light microscope (Biolam, LOMO, Russia: lens $\times 40$, eyepiece $\times 7$) in 7-10 fields of view of the intensive ICH-reaction of each section, calculating the arithmetic mean, within the tumor nests and tumor stroma. The count included immunopositive cells with macrophage morphology. Microphotographs were obtained using the Leica DM500 microscope, Leica, Germany (lens $\times 4$, 40). The statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism 5 software, using nonparametric, parametric and simulation methods.

The study is organized as a descriptive pathomorphological comparison between the two groups: N0 and N1, triple-negative BC, comparison of quantitative characteristics of CD68+ and CD163+M2-like fraction of TAM, as well as for verification of possible correlation relations between the quantitative characteristics of macrophages in the primary tumor and in the corresponding metastasis in the ipsilateral axillary lymph nodes. Increased level of infiltration of the primary focus of TNBC with CD68+TAM and CD163+M2-like macrophages is reliably associated with metastasis. It is assumed that the M1-like subpopulation of TAM most closely contacts with tumor nests in TNBC, which may be a prerequisite for the spread of the tumor, or metastasis. Primary premetastatic effects of TNBC may be related to the increase of not only M2, but also M1 macrophages. In metastatic lymph nodes, the amount of CD68+TAM was significantly lower than that of primary TNBC, whereas the quantitative indices of CD163+M2 correlated. Along with the localization and co-localization of CD68+ and CD163+M2-like TAMs, the results conform with the generally accepted paradigm that M1 TAM has an anti-tumoral but lower potential and M2 – the protumoral one, but this is shown for metastases in the regional lymph nodes in primary-metastatic TNBC. Precise quantitative TAM indices for the use in clinical practice have not been developed, although their pathogenetic significance and quantitative variations are reliable according to metastasis and other clinical data of TNBC.

Key words: tumor-associated macrophages, immunohistochemical studies, CD68+ and CD163+, triple-negative subgroup, breast cancer.

Рецензент – проф. Старченко І. І.

Стаття надійшла 25.11.2018 року