

## ТКАНЕВАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ИНВАЗИВНОГО ПРОТОКОВОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ НАЛИЧИИ МЕТАСТАЗОВ В РЕГИОНАРНЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ

Жураковский И.П., Давлетова К.И., Архипов С.А., Аутеншлюс А.И.

*ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, e-mail: murash2003@yandex.ru*

Проведен морфометрический анализ операционного материала от 30 пациентов в возрасте от 42 до 77 лет с инвазивным протоковым раком молочной железы. По результатам патогистологического исследования у 9 из них были выявлены метастазы в регионарные лимфатические узлы, а у 21 пациента – отсутствие лимфогенного метастазирования. Исследование тканевой организации опухоли позволило выявить ее особенности при наличии метастазов. При этом были выявлены корреляционные связи между: наличием лимфогенного метастазирования и количеством патологических митозов ( $r = 0,616$ ;  $p < 0,001$ ), степенью злокачественности ( $r = 0,487$ ;  $p = 0,006$ ), количеством микрососудов в железисто-тубулярной зоне ( $r = 0,515$ ;  $p = 0,004$ ), относительной площадью, занимаемой опухолеассоциированными макрофагами в зоне опухолевой инфильтрации ( $r = 0,513$ ;  $p = 0,004$ ), относительной площадью, занимаемой опухолеассоциированными макрофагами в зоне параканкрозного воспаления ( $r = 0,698$ ;  $p < 0,001$ ), количеством микрососудов в зоне параканкрозной инфильтрации ( $r = 0,471$ ;  $p = 0,009$ ). Проведенное исследование показало, что микроокружение опухоли является важным фактором, сопутствующим лимфогенному метастазированию опухоли. Причем, как показал ROC-анализ, плотность опухолеассоциированных макрофагов в зоне параканкрозного воспаления показывает более высокую качество модели (AUC = 0,939) по сравнению с количеством патологических митозов (AUC = 0,884) и суммой баллов, отражающей степень злокачественности (AUC = 0,786). Полученные данные свидетельствуют о том, что повышение количества опухолеассоциированных макрофагов может служить чувствительным индикатором лимфогенного метастазирования.

Ключевые слова: инвазивный протоковый рак, молочная железа, лимфогенное метастазирование, опухолеассоциированные макрофаги, морфометрический анализ.

## TISSUE ORGANIZATION OF INVASIVE DUCTAL BREAST CANCER WITH METASTASES IN REGIONAL LYMPH NODES

Zhurakovsky I.P., Davletova K.I., Arkhipov S.A., Autenshlyus A.I.

*SBEI HPE “Novosibirsk State Medical University”, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, e-mail: murash2003@yandex.ru*

Morphometric analysis of surgical material from 30 patients aged 42 to 77 years with invasive ductal breast cancer was performed. According to the results of the pathohistological study, nine of them had metastases to the regional lymph nodes, and 21 patients had no lymphogenous metastasis. The study of tissue organization of the tumor allowed to reveal its features in the presence of metastases. At the same time correlation were identified between: the presence of nodal metastasis and the number of abnormal mitoses ( $r = 0,616$ ;  $p < 0,001$ ), the degree of malignancy ( $r = 0,487$ ;  $p = 0,006$ ), the number of microvessels in glandular tubular zone ( $r = 0,515$ ;  $p = 0,004$ ), the relative area occupied by tumor-associated macrophages in tumor infiltration area ( $r = 0,513$ ;  $p = 0,004$ ), the relative area occupied by macrophages in the area of paracancroic inflammation ( $r = 0,698$ ;  $p < 0,001$ ), the number of microvessels in the region of paracancroic infiltration ( $r = 0,471$ ;  $p = 0,009$ ). The conducted research has shown that the tumor microenvironment is an important factor accompanying to lymphogenous metastasis of the tumor. Moreover, as shown by ROC analysis, the density of tumor-associated macrophages in the area of paracancroic inflammation shows a higher quality of the model (AUC = 0.939) compared to the number of pathological mitoses (AUC = 0.884) and the score reflecting the degree of malignancy (AUC = 0.786). The obtained data indicates that an increase in the number of tumor-associated macrophages can serve as a sensitive indicator of lymphogenous metastasis.

Keywords: invasive ductal cancer, mammary gland, lymphogenous metastasis, tumor-associated macrophages, morphometric analysis.

Рак молочной железы является наиболее распространенной формой рака у женщин [1]. При этом отмечается, что заболеваемость и смертность от рака молочной железы

неуклонно растет [2]. По литературным данным около 90 % смертей, связанных с раком, возникают из-за его метастатического распространения [3]. Вместе с тем отмечается, что процесс метастазирования по кровеносным сосудам изучен значительно лучше, чем лимфогенный путь, несмотря на то, что наличие лимфогенного метастазирования – это ключевой показатель менее благоприятного прогноза в большинстве эпителиальных раков [4].

За последние несколько десятилетий традиционная точка зрения на рак, как однородной массы быстро пролиферирующих злокачественных клеток, претерпела существенные изменения. В подавляющем большинстве работ указывается на то, что раковый узел – сложная ткань, которая состоит из нескольких типов клеток. Иммунокомпетентные и другие клетки хозяина составляют микросреду, которая поддерживает рост, способствует прогрессированию и метастазированию опухоли [5; 6]. В этой связи исследования, посвященные тканевой организации опухолей, могут способствовать более полному пониманию механизмов, определяющих сложный процесс метастазирования.

Цель исследования: изучить тканевую организацию инвазивного протокового рака молочной железы при наличии и отсутствии метастазов в регионарные лимфатические узлы.

#### **Материал и методы исследования**

Проведено исследование операционного материала 30 пациентов в возрасте от 42 до 77 лет с диагнозом инвазивный протоковый рак молочной железы. По результатам патогистологического исследования у 9 из них (пациенты 1-й группы) были выявлены метастазы в регионарные лимфатические узлы, и у 21 пациента (2 группа) было диагностировано отсутствие лимфогенного метастазирования. Морфометрическое исследование биоптатов удаленных опухолей проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Для описания патогистологической картины инвазивного протокового рака молочной железы выделяли три зоны: железисто-тубулярную, опухолевой инфильтрации и параканкрозного воспаления. Морфометрический анализ проводился на полученных предварительно 8 микрофотографиях для каждой зоны. При оценке принадлежности опухолевых клеток к высокодифференцированным, умереннодифференцированным и низкодифференцированным элементам учитывали степень выраженности клеточного полиморфизма, ядерно-цитоплазматическое соотношение, наличие митозов, в том числе патологических, способность к структурообразованию (формированию желез), сохранение функций клеток. Высокодифференцированные клетки имели мономорфные мелкие ядра с четким контуром, равномерным хроматином, сходные с ядрами нормальных эпителиальных

клеток и способностью образовывать железистые структуры. Низкодифференцированные клетки характеризовались неправильной формой, выраженным полиморфизмом, ядра имели полиморфное строение, с четкими ядрышками и отсутствием способности к формированию структур. Умереннодифференцированные клетки занимали промежуточное положение между высоко- и низкодифференцированными по выраженности вышеуказанных признаков. Анализ относительной площади клеточных элементов проводился с помощью программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США) с дополнительными модулями Grid и Cell Counter, обеспечивающими создание морфометрической сетки с 130 рабочими точками-узлами на цифровых изображениях со способностью случайного смещения координат, а также подсчет исследуемых элементов. Определяли сумму баллов, отражающих степень злокачественности в соответствии с гистологической градацией рака молочной железы, рекомендованной ВОЗ [7].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного пакета для статистической обработки SPSS v 17.0 for Windows. Для сравнения независимых групп использовали критерий Крускала – Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью критерия Манна – Уитни. Различия между значениями сравниваемых параметров расценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$ . Полученные в ходе исследования данные представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах (Q1; Q3). Рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ), и проводили ROC-анализ.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Результаты исследования позволили установить, что при сравнении морфометрических показателей опухолевой ткани больных с инвазивным протоковым раком молочной железы отмечались статистически значимые различия между пациентами, имеющими метастазы в регионарные лимфатические узлы, и пациентами, у которых они отсутствовали (табл. 1). Достаточно примечательным является тот факт, что из исследованных морфологических параметров, характеризующих опухолевую ткань пациентов обеих групп, достоверно различались показатели, отражающие состояние как опухолевых клеток, так и стромы, а именно степень васкуляризации и микроокружение опухоли. Последнему фактору в современной литературе, посвященной проблемам патогенеза опухолевой прогрессии, уделяется пристальное внимание, поскольку изменение характера микроокружения опухоли у больных раком молочной железы коррелирует со снижением безрецидивной и общей выживаемости [8]. Кроме того, отмечается, что характер микроокружения влияет на степень васкуляризации опухоли [9].

Данные морфометрического анализа инвазивного протокового рака по зонам опухоли

Me (Q1; Q3)

Показатель		1 группа (n = 9)	2 группа (n = 21)
Железисто-губулярная зона	Митозы (количество на тестируемой площади)	27,0 (25,5; 29,0)	23,0 (19,5; 27,0)
	Патологические митозы (количество на тестируемой площади)	10,0 (8,0; 12,0)*	4,0 (3,0; 7,0)
	% низкодифференцированных клеток	13,7 (8,5; 22,7)	15,1 (7,2; 20,7)
	% умереннодифференцированных клеток	69,0 (59,4; 70,8)	65,9 (59,3; 68,9)
	% высокодифференцированных клеток	16,1 (8,0; 26,7)	14,6 (12,0; 27,7)
	Количество микрососудов (на тестируемой площади)	6,0 (5,0; 11,5)*	3,0 (1,0; 5,0)
Зона опухолевой инфильтрации	Относительная площадь, занимаемая лимфоцитами	9,4 (6,6; 17,7)	6,6 (3,2; 17,4)
	Относительная площадь, занимаемая макрофагами/моноцитами (в %)	4,2 (1,3; 5,7)*	0,8 (0,4; 2,2)
	Относительная площадь, занимаемая гранулоцитами (в %)	0,1 (0,1; 0,5)	0,1 (0,0; 0,2)
	Относительная площадь, занимаемая опухолевыми клетками (в %)	23,9 (19,2; 32,1)	18,0 (14,4; 25,9)
	Относительная площадь, занимаемая фибробластами (в %)	8,9 (7,1; 11,9)	8,1 (6,3; 10,0)
	Количество микрососудов (на тестируемой площади)	9,0 (3,0; 11,5)	6,0 (3,0; 11,0)
Зона параканкрозного воспаления	Относительная площадь, занимаемая лимфоцитами (в %)	29,2 (25,7; 43,2)	19,6 (6,5; 38,7)
	Относительная площадь, занимаемая макрофагами/моноцитами (в %)	4,6 (3,7; 6,3)*	1,1 (0,7; 1,9)
	Относительная площадь, занимаемая гранулоцитами (в %)	0,2 (0,0; 0,4)	0,0 (0,0; 0,1)
	Относительная площадь, занимаемая иммунокомпетентными клетками (в %)	35,4 (29,5; 49,4)	22,6 (7,2; 40,1)
	Количество микрососудов (на тестируемой площади)	9,0 (7,5; 15,0)*	5,0 (4,0; 9,0)
Сумма баллов, определяющих степень	6,0 (6,0; 7,0)*	5,0 (5,0; 6,0)	

злокачественности #		
Количество сосудов (на препарате опухоли)	25,0 (9,0; 29,0)	12,0 (6,0; 21,5)

\* – достоверные различия по сравнению с группой пациентов с инвазивным протоковым раком, не имеющих метастазы в регионарные лимфатические узлы, при  $p < 0,05$ ;

# – баллы определялись в соответствии с гистологической градацией рака молочной железы, рекомендованной ВОЗ [6].

Анализ изученных показателей тканевой организации инвазивного протокового рака молочной железы позволил выявить положительные корреляционные связи между наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах и: 1) количеством патологических митозов ( $r = 0,616$ ;  $p < 0,001$ ); 2) степенью злокачественности ( $r = 0,487$ ;  $p = 0,006$ ); 3) количеством микрососудов в железисто-тубулярной зоне ( $r = 0,515$ ;  $p = 0,004$ ); 4) относительной площадью, занимаемой опухолеассоциированными макрофагами в зоне опухолевой инфильтрации ( $r = 0,513$ ;  $p = 0,004$ ); 5) относительной площадью, занимаемой опухолеассоциированными макрофагами в зоне параканкрозного воспаления ( $r = 0,698$ ;  $p < 0,001$ ); 6) количеством микрососудов в зоне параканкрозной инфильтрации ( $r = 0,471$ ;  $p = 0,009$ ). Также были выявлены положительные корреляционные связи между количеством лимфатических узлов с метастазами и: 1) количеством патологических митозов ( $r = 0,593$ ;  $p = 0,001$ ); 2) степенью злокачественности ( $r = 0,507$ ;  $p = 0,004$ ); 3) количеством микрососудов в железисто-тубулярной зоне ( $r = 0,530$ ;  $p = 0,003$ ); 4) относительной площадью, занимаемой опухолеассоциированными макрофагами в зоне опухолевой инфильтрации ( $r = 0,515$ ;  $p = 0,004$ ); 5) относительной площадью, занимаемой опухолеассоциированными макрофагами в зоне параканкрозного воспаления ( $r = 0,673$ ;  $p < 0,001$ ); 6) количеством микрососудов в зоне параканкрозной инфильтрации ( $r = 0,499$ ;  $p = 0,005$ ).

Для выявления показателей, имеющих наибольшую ценность для характеристики патологического процесса в плане метастатического поражения регионарных лимфатических узлов, был проведен ROC-анализ, результаты которого представлены в таблице 2.

Таблица 2

Данные ROC-анализа у пациентов с инвазивным протоковым раком молочной железы для переменной состояния, характеризующей наличие метастазов в регионарные лимфатические узлы

Тестовая переменная	Площадь под кривой	Стандартная ошибка	Значимость	Качество модели
Количество патологических митозов	0,884	0,067	0,001	Очень хорошее
Количество микрососудов в железисто-тубулярной зоне	0,823	0,075	0,006	Очень хорошее

Относительная площадь, занимаемая опухолеассоциированными макрофагами в зоне опухолевой инфильтрации	0,823	0,086	0,006	Очень хорошее
Относительная площадь, занимаемая опухолеассоциированными макрофагами в зоне параканкрозного воспаления	0,939	0,042	< 0,0001	Отличное
Сумма баллов, отражающая степень злокачественности	0,786	0,087	0,015	Хорошее

Таким образом, повышение относительной площади, занимаемой опухолеассоциированными макрофагами в зоне параканкрозного воспаления, является наиболее чувствительным индикатором наличия метастазов в регионарные лимфатические узлы по сравнению с другими показателями.

Многочисленные исследования подтверждают, что количество опухолеассоциированных макрофагов сопряжено с плохим прогнозом заболевания у пациентов с раком различной локализации [10-12]. В отношении рака молочной железы было показано, что относительное количество опухолеассоциированных макрофагов связано со стадией заболевания и его негативным прогнозом [6]. Это объясняется тем, что опухолеассоциированные макрофаги способствуют росту опухоли [5;13], поскольку стимулируют ангиогенез в опухолевой ткани [14]. Кроме того, отмечается, что комплекс опухолеассоциированных макрофагов и фибробластов сопряжен с метастазированием рака молочной железы [15].

### **Заключение**

Проведенное исследование тканевой организации инвазивного протокового рака молочной железы позволило выявить ее особенности при наличии и отсутствии метастазов в регионарные лимфатические узлы. Были выявлены корреляционные связи между наличием метастазов в регионарные лимфатические узлы и количеством патологических митозов, суммой баллов, определяющих степень злокачественности, количеством микрососудов в железисто-тубулярной зоне, относительной площадью, занимаемой опухолеассоциированными макрофагами в зоне опухолевой инфильтрации, относительной площадью, занимаемой опухолеассоциированными макрофагами в зоне параканкрозного воспаления, и количеством микрососудов в зоне параканкрозной инфильтрации. Выраженность клеточной инфильтрации является важным признаком лимфогенного метастазирования опухоли. Увеличение относительного содержания опухолеассоциированных макрофагов в зоне параканкрозного воспаления является более

показательным признаком метастазирования в регионарные лимфатические узлы, чем количество патологических митозов или степень злокачественности опухоли, а следовательно, он может служить в качестве индикатора лимфогенного метастазирования.

### Список литературы

1. Stewart B.W., Wild C.P. World cancer report 2014. The Health Well. [January 17th, 2017]. – URL: <http://www.thehealthwell.info/node/725845>.
2. Basic Facts of Breast Cancer in Korea in 2014: The 10-Year Overall Survival Progress. /Park E.H. [et al.] //Korean Breast Cancer Society. J. Breast Cancer. – 2017. – Vol. 20, No.1. P.1-11.
3. Mehlen P., Puisieux A. Metastasis: a question of life or death //Nat Rev Cancer. 2006. No. 6. P. 449-458.
4. Banyard J., Bielenberg D.R. The role of EMT and MET in cancer dissemination // Connect Tissue Res. 2015. Vol. 56, no. 5. P. 403-13.
5. Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis // Cell. 2010. Vol. 141, no.1. P. 39-51.
6. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis /Yang J. [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2015. Vol. 8. P. 6656–6664.
7. Elston C.W., Ellis I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I/ The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up // Histopathology. 1991. Vol. 19, no. 5. P. 403-410.
8. Bingle L., Brown N.J., Lewis C.E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies // The Journal of Pathology. 2002. Vol. 196, no. 3. P. 254–265.
9. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis / Murdoch C. [et al.] // Nature Reviews Cancer. 2008. Vol. 8, no. 8. P. 618–631.
10. High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer /Tiainen S. [et al.] // Histopathology. 2015. Vol. 66. P. 873–883.
11. Supraglottic laryngeal tumor microenvironmental factors facilitate STAT3 dependent pro-tumorigenic switch in tumor associated macrophages to render utmost immune evasion /Goswami K.K. [et al.] // Immunol Lett. 2013. Vol. 156. P. 7–17.

12. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma /Fan QM [et al.] // *Cancer Lett.* 2014. Vol. 352. P. 160–168.
13. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis // *Cell.* 2006. Vol. 124, no. 2. P. 263–266.
14. Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis // *Cell.* 2010. Vol. 141, no. 1. P. 39–51.
15. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis /Su S. [et al.] // *Cancer Cell.* 2014. Vol. 25, no. 5. P. 605–620.