

УДК 616-006.04:577.2

**ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДТИПОВ РАКА МОЛОЧНОЙ  
ЖЕЛЕЗЫ****Новикова И.А., Шатова Ю.С., Златник Е.Ю., Пржедецкий Ю.В.,  
Ульянова Е.П., Черникова Е.Н.***ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,  
Ростов-на-Дону, e-mail: rnioi@list.ru, novikovainna@yahoo.com*

Биологическое поведение опухоли, в частности, рака молочной железы (РМЖ), зависит от характеристик ее клеток и от микроокружения. Нами впервые проведено исследование пролиферативных свойств опухолевых клеток и тканевого состава лимфоцитарных субпопуляций в зависимости от молекулярно-биологического подтипа РМЖ. Показано, что люминальный А подтип по данным критериям является наиболее благоприятным (минимальное содержание анеуплоидных опухолевых клеток; высокое содержание НК-лимфоцитов). РМЖ Her2+neu подтипа демонстрирует высокое содержание НК-лимфоцитов в перитуморальной зоне, но не в опухоли. Высокое количество анеуплоидных клеток найдено при люминальном В подтипе, клеток в S-фазе – при ТНР. Описанные различия позволяют оценить молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы с ранее не исследованных позиций и ставят задачу изучения возможности прогнозирования течения заболевания с помощью полученных данных.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, молекулярно-биологические подтипы, тканевые лимфоциты, ДНК-цитометрия, пролиферация

**PROLIFERATIVE AND IMMUNOLOGIC CHARACTERISTICS OF DIFFERENT  
BREAST CANCER BIOMOLECULAR SUBTYPES****Novikova I.A., Shatova Y.S., Zlatnik E.Y., Przhedetsky Y.V.,  
Ulianova E.P., Chernikova E.N.***FSBI «Rostov Research Oncological Institute» MH RF,  
Rostov-on-Don, e-mail: rnioi@list.ru, novikovainna@yahoo.com*

Biologic behaviour of malignant tumor (for example, breast carcinoma), depends upon peculiarities of its cells' properties and microenvironment. Well-known biomolecular subtypes, different in clinical course of the disease, were established on the basis of 4 receptors detected by immunohistochemical test. We carried out complex study of proliferative activity and lymphocytes' subsets in tumor and peritumoral tissue; comparative characteristics of breast carcinoma subtypes was given according to the studied criteria. Luminal A subtype was shown to be the most favourable having minimal per cent of aneuploid cells while NK-lymphocytes' content in tumor was the highest. In Her2+/neu carcinoma NK-lymphocytes' level was high in peritumoral tissue but not in tumor. High proportion of aneuploid cells was found in luminal B subtype and high content of cells in S-phase – in TNR tumors. The described difference may allow to assess breast carcinoma's biomolecular subtypes from the new point and to set the task to use the obtained data for its prognosis.

**Keywords:** breast carcinoma biomolecular subtypes, DNA-cytometry, tissue lymphocytes tumor cells' proliferation

Биологическое поведение злокачественной опухоли, которое характеризует скорость ее роста, способность к инвазии и распространению, а, в конечном итоге, и прогноз заболевания, зависит от многих причин, связанных как с ее особенностями, так и с эффективностью или неэффективностью системных защитных механизмов, среди которых важное место занимают иммунные. По-видимому, свойства опухоли и реакции иммунной системы организма на нее тесно взаимосвязаны. С учетом значения иммунокомпетентных клеток в процессах апоптоза, пролиферации, неоангиогенеза (в частности, через продукцию цитокинов), их роль в микроокружении опухоли представляется существенной, однако, не полностью проясненной.

Рак молочной железы (РМЖ) является самой распространенной злокачественной

опухолью среди женского населения планеты, и, несмотря на то, что его патогенезу, ранней диагностике и разработке новых методов лечения посвящено множество работ, продолжает оставаться актуальнейшей проблемой онкологии и медицины в целом.

Серьезный прорыв в изучении этого заболевания был сделан с появлением новых методов характеристики опухолевых клеток, в частности, иммуногистохимического (ИГХ)-типирования и ДНК-цитометрии. На основании их результатов были выделены молекулярно-биологические подтипы РМЖ и установлено, что они отличаются различным характером течения, по-разному поддаются химиотерапии и имеют неодинаковый прогноз. Молекулярно-генетическая классификация РМЖ, разработанная на основе иммуногистохимического определения четырех маркеров, была одобрена эксперта-

ми Сент-Галленской конференции в 2011 г и уточнена в 2013 г. Эти маркеры (рецепторы эстрогена, прогестерона, Her2+/neu, Ki-67) оцениваются в большинстве работ для решения вопроса о целесообразности назначения гормональной и химиотерапии [6, 7, 8]. Представляется возможной связь подтипов РМЖ с экспрессией опухолевыми клетками рецепторов, характеризующих апоптоз [1]. Согласно данным современной литературы, признаком агрессивного биологического поведения опухоли является анеуплоидия, при которой частота лимфогенного метастазирования различных опухолей существенно повышается; у больных с анеуплоидными опухолями выше частота рецидивов и короче продолжительность клинической ремиссии. ДНК-цитометрические характеристики опухолевых клеток могут прогнозировать их биологические свойства поведения опухоли в будущем [3, 4]. В немногочисленных сообщениях описана лимфоцитарная инфильтрация при РМЖ [2, 5], но не найдено работ, сопоставляющих молекулярно-биологические подтипы РМЖ с пролиферативными свойствами опухоли и особенностями ее лимфоцитарного микроокружения.

Целью работы является характеристика иммунологического микроокружения и пролиферативных свойств опухоли при различных молекулярно-биологических подтипах РМЖ.

### Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили кровь и ткани опухоли и перитуморальной зоны 49 пациентов различными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ; у 16 (32,7%) был определен люминальный А подтип, у 22 (44,9%) – люминальный В, у 5 – Her2+/neu (10,2%), у 6 – ТНР (12,2%). Гомогенизацию тканей осуществляли с использованием BD Medimachine. Анализ экспрессии (не менее 20 000 клеток) проводили на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, USA). Для тестирования и подтверждения оптимальной работы проточного цитометра использовали универсальные биологические частицы DNA QC Particles (BD). Для анализа ДНК в ткани опухоли использовали CycleTEST™PLUS DNA Reagent Kit. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы ModFit LT, позволяющей ана-

лизировать плоидность и распределение клеток опухоли по фазам клеточного цикла и детализировать число клеток в фазах S и G2 + M. Долю клеток с различным содержанием ДНК на гистограмме вычисляли как процент от общего числа исследованных клеток. Опухоль считали диплоидной, если выявлялся один пик, который соответствовал нормальному содержанию ДНК в ядрах клеток. При наличии пиков, отличающихся от диплоидного, опухоль расценивалась как анеуплоидная. Для характеристики степени анеуплоидии клеток опухоли вычисляли индекс ДНК (ИДНК), который характеризует отношение интенсивности флуоресценции пика анеуплоидных клеток (номер канала) к диплоидному. Проллиферативную активность опухолевых клеток оценивали по индексу пролиферации (ИП) – сумме клеток, находящихся в синтетической, постсинтетической фазах цикла и в митозе (S+G2+M).

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови, ткани опухоли и перитуморальной зоны (ПЗ) оценивали с использованием моноклональных антител панели Т-В-НК (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56) и CD45. Доля лимфоцитов, положительных по данным маркерам, вычислялась в процентах от общего числа CD45-положительных лимфоцитов. В случае ткани исследовалось не менее 1000 тыс. событий, крови – не менее 30 тыс. событий.

Статистическую обработку результатов проводили параметрическими и непараметрическими методами (t-критерий Стьюдента, критерий Уилкоксона).

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования субпопуляций лимфоцитов в крови и в тканевых образцах представлены в табл. 1, 2. Как видно из табл. 1, ткань опухоли характеризовалась статистически достоверно более высоким содержанием Т-лимфоцитов, преимущественно за счет CD3+CD8+ клеток; при этом процент В- и НК-клеток в ней был ниже, чем в крови. В ткани ПЗ наблюдались отличия как от крови, так и от опухоли: в ней отмечено более высокое количество CD3+ и CD3+CD8+ клеток и более низкое CD19+ лимфоцитов, чем в крови; процент CD3+CD4+ лимфоцитов был ниже, а уровень CD3+CD16/56+ выше, чем в опухоли.

В табл. 2 приведено сопоставление субпопуляционного состава тканевых лимфоцитов больных при различных молекулярно-биологических подтипах РМЖ.

Таблица 1

Субпопуляционный состав лимфоцитов в крови и в тканях больных РМЖ

Исследуемые образцы	Субпопуляции лимфоцитов, %				
	CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD19+	CD16+/56+
Кровь	60,1 ± 4,5	43,3 ± 6,1	20,3 ± 5,36	13,3 ± 4,74	17,5 ± 3,54
Опухоль	85,9 ± 2,36*	42,5 ± 1,98**	34,0 ± 1,9*	2,56 ± 0,5*	8,76 ± 0,83* **
ПЗ	76,0 ± 3,65*	34,7 ± 1,97	39,4 ± 2,76*	3,05 ± 1,17*	15,1 ± 2,9

Примечание: \* – статистически достоверные отличия от показателей периферической крови; \*\* – статистически достоверные отличия от показателя ПЗ (P ≤ 0,05).

Таблица 2

Субпопуляционный состав лимфоцитов опухоли при различных молекулярно-биологических подтипах РМЖ

Подтипы РМЖ	Субпопуляции лимфоцитов, %				
	CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD19+	CD16+/56+
Люминальный А	85,5 ± 2,55	45,1 ± 4,0	40,1 ± 3,95	1,82 ± 0,64	10,6 ± 1,73
Люминальный В	88,48 ± 2,16	46,66 ± 3,3	43,9 ± 3,4	3,25 ± 1,1	4,34 ± 1,27*
ТНР	92,2 ± 1,4*	45,0 ± 6,0	40,6 ± 8,33	2,28 ± 0,98	4,13 ± 1,63*
Her2+/neu	88,6 ± 6,5	47,4 ± 3,5	39,8 ± 10,0	1,23 ± 0,5	7,13 ± 4,0

Примечание: \* – статистически достоверные отличия от люминального А подтипа ( $P \leq 0,05$ ).

Как видно из табл. 2, отмечаются некоторые различия по составу субпопуляций лимфоцитов, присутствующих в образцах тканей опухоли в зависимости от молекулярно-биологического подтипа РМЖ. Так, в опухолевой ткани максимальное количество CD3+ клеток оказалось при ТНР, хотя статистически достоверные различия установлены только от люминального А РМЖ ( $P \leq 0,05$ ). При люминальном А РМЖ обнаружен наибольший уровень НК-клеток в опухолевой ткани, статистически значимо превышающий показатели люминального В и ТНР РМЖ (в обоих случаях  $P \leq 0,05$ ).

При изучении ткани ПЗ обнаружен наиболее высокий уровень НК-клеток при Her2+/neu+ РМЖ по сравнению с другими вариантами заболевания ( $23,1 \pm 4,75\%$ ); кроме того, он был в 3 раза выше, чем в опухолевой ткани этих же больных. В тех же образцах ткани ПЗ количество CD3+ и CD3+CD4+ оказалось ниже, чем в ткани опухоли ( $70,4 \pm 2,6$  и  $88,6 \pm 6,5\%$  для CD3+;  $33,1 \pm 5,2$  и  $47,4 \pm 3,5\%$  для CD3+CD4+ соответственно; в обоих случаях  $P \leq 0,05$ ). Сходные различия между лимфоцитарным составом ткани опухоли и ПЗ отмечены и при люминальном В РМЖ: уровень CD3+CD4+ в ткани ПЗ составлял  $34,4 \pm 4,2\%$ , что статистически достоверно ниже показателя в ткани опухоли ( $46,66 \pm 3,3\%$ );  $P \leq 0,05$ .

Результаты исследования ДНК-цитометрических параметров опухолей представлены в табл. 3. Минимальная доля анеуплоидных опухолей выявлена при люминальном А, средняя при люминальном В и максимальная при ТНР. Результаты ДНК-цитометрического анализа Her2+/neu РМЖ в данную работу не включены. При РМЖ люминального А подтипа доля анеуплоидных опухолей составила 12,5%, где 2 из 16 образцов характеризовались уровнем ДНК, отличным от 1,0, тогда как в группе опухолей люминального В подтипа их доля составила 45,5% (10 из 22 опухолей), а в группе ТНР – 50% (3 из 6).

Опухоли с ИДНК менее 1,0 не встретились ни в одном из подтипов анеуплоидного РМЖ (люминального А, люминального В, ТНР). В РМЖ люминального А подтипа ИДНК в среднем составил  $1,67 \pm 0,2$ ; при люминальном В подтипе ИДНК – от 1,1 до 2,0, в среднем  $1,67 \pm 0,1$ ; при ТНР подтипе – от 1,49 до 1,76, в среднем  $1,63 \pm 0,07$ . Статистически достоверных различий в средних показателях ИДНК между опухолями различных молекулярных подтипов не получено. В опухолях с люминальным А подтипом в 50% (1 из 2 анеуплоидных опухолей) ИДНК находился в пределах до 1,5; в 50% превышал 1,5. Практически с одинаковой частотой в 30% (3 из 10 анеуплоидных опухолей) и 33,3% (1 из 3), соответственно при РМЖ люминального В и ТНР подтипов отмечено наличие опухолей с ИДНК до 1,5, где преобладали опухоли с индексом ДНК свыше 1,5.

Злокачественные опухоли, как правило, являются гетерогенными, т.е. в одной опухоли могут сочетаться диплоидные и анеуплоидные клетки, и одним из определяющих биологическое поведение опухоли может быть характеристика среднего содержания в ней анеуплоидных клеток. Проведенный анализ выявил, что среднее содержание анеуплоидных клеток в опухолях люминального А подтипа составило  $8,49 \pm 0,9\%$ , а в ТНР –  $17,6 \pm 3,2\%$ . Максимальное содержание анеуплоидных клеток ( $26,5 \pm 2,8\%$ ) отмечено в опухолях люминального В подтипа, что в 3,1 и 1,5 раза выше, чем в опухолях люминального А и ТНР подтипов соответственно ( $P \leq 0,05$ ).

Распределение клеток по фазам клеточного цикла опухолей молочной железы люминального А, люминального В и ТНР подтипов представлено в табл. 3.

Как видно из табл. 3, в опухолях исследуемых подтипов основная масса клеток находилась в G0/G1-фазе клеточного цикла. Статистически достоверной разницы в показателях доли клеток в G0/G1- и G2+M-фазах клеточного цикла между различными

молекулярными подтипами не получено. Темпы пролиферации опухолей ТНР молекулярного подтипа, определяемые по доле клеток в S-фазе клеточного цикла, статистически значимо превосходили аналогичный показатель опухолей люминального В подтипа ( $P \leq 0,05$ ). Статистически достоверных различий в темпах пролиферации опухолей люминального А и люминального В подтипа, а также люминального А и ТНР молекулярных подтипов не получено, хотя отмечена тенденция к повышению доли клеток в S-фазе опухолей люминального А подтипа по сравнению с люминальным В.

**Таблица 3**  
Распределение клеток по фазам клеточного цикла при различных молекулярно-биологических подтипах РМЖ (%)

Молекулярно-биологические подтипы	Фазы клеточного цикла		
	G0/G1	G2+M	S
Люминальный А	83,5 ± 5,6	1,18 ± 0,2	15,4 ± 2,4
Люминальный В	88,2 ± 1,9	1,5 ± 0,4	10,8 ± 1,9
ТНР	81,7 ± 5,5	0,9 ± 0,07	18,4 ± 3,3*

**Примечание:** \* – отличия показателей статистически достоверны по отношению к люминальному В подтипу ( $P \leq 0,05$ ).

Пролиферативная активность является одним из ведущих факторов биологического поведения опухоли. При сравнении ИП статистически достоверной разницы при люминальном А, люминальном В и ТНР подтипах РМЖ не выявлено, хотя в опухолях ТНР подтипа отмечена тенденция к его повышению в сравнении с люминальными А и В.

Итак, статистически значимые различия пролиферативных характеристик исследованных молекулярно-биологических подтипов РМЖ были получены только по частоте анеуплоидии и проценту анеуплоидных опухолевых клеток, а также по количеству клеток в S-фазе клеточного цикла. Данные показатели были минимальны при люминальном А подтипе. При сравнении люминального В и ТНР подтипов их характеристики анеуплоидии не различались, но процент клеток в S-фазе был наибольшим в ТНР опухолях, что, по-видимому, и обуславливает их более злокачественное течение.

Лимфоцитарная инфильтрация РМЖ может быть различной, т.к. антигенный его состав неоднороден: наличие или отсутствие экспрессии опухолевыми клетками РЭА, MUC-1, HLA I и II класса ассоциировано с различной степенью вовлеченности иммунокомпетентных клеток в противоопухоле-

вый ответ [2]. Нами показаны различия содержания НК-лимфоцитов – эффекторных клеток врожденного иммунитета, участвующих в антиген-независимом лизисе мишеней, в опухолях изученных молекулярно-биологических подтипов РМЖ. Количество этих клеток при люминальном А подтипе было выше, чем при других. Учитывая, что опухолевые клетки нередко являются HLA-негативными [2], и, следовательно, представляют возможную мишень не для цитотоксических (CD8+) Т-лимфоцитов, прогностическая роль которых описана для HLA-DR позитивных опухолей [5], а именно для натуральных киллеров, мы считаем, что полученные нами данные характеризуют люминальный А подтип РМЖ как наиболее благоприятный по особенностям его лимфоцитарного окружения. Этот же подтип РМЖ отличается минимальным среди всех содержанием анеуплоидных опухолевых клеток. Люминальный В подтип при наименьшем количестве опухолевых клеток в S-фазе демонстрирует высокую частоту анеуплоидных клеток и опухолей; микроокружение характеризуется низким уровнем НК-клеток и повышением содержания CD3+CD4+ клеток в опухоли по сравнению с ПЗ. ТНР подтип содержит высокое количество опухолевых клеток в S-фазе при высоком содержании анеуплоидных клеток; в окружении находится наибольшее количество Т(CD3+) – и низкое – НК-лимфоцитов. РМЖ Her2+/neu подтипа отличается высоким содержанием НК-клеток в перитуморальной зоне, но не в опухоли.

**Список литературы**

1. Кит О.И., Шатова Ю.С., Новикова И.А., Владимиров Л.Ю., Ульянова Е.П., Комова Е.А., Кечеджиева Э.Э. Экспрессия p53 и BCL2 при различных подтипах рака молочной железы // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 10. – С. 85–88.
2. Летагин В.П. Варианты иммунофенотипа рака молочной железы и их клиническое значение для прогноза / В.П. Летагин, Н.Н. Тупицын, Е.В. Артамонова // VII российская онкологическая конференция: матер. конф. – М., 2003. – С. 50–53.
3. Новоселова К.А. Проточная ДНК-цитометрия в прогнозировании течения злокачественных лимфом / К.А. Новоселова, И.Б. Лысенко, И.А. Новикова // *Сибирский онкологический журнал*. – 2012. – Прилож. № 1. – С. 114.
4. Опыт применения проточной ДНК-цитометрии для прогнозирования течения злокачественных новообразований / Т.Г. Николаева, Я.В. Добрынин, В.П. Летагин и др. // *Вестник Российской Академии медицинских наук*: ежемесячный научно-теоретический журнал. – 2002. – №1. – С. 45–49.
5. Шамилов Ф.А. Субпопуляции интратуморальных лимфоцитов при раке молочной железы // *Онкология*. – 2012. – № 2. – С. 60–65.
6. Ki 67 index, HER-2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer / M.C.U. Cheang, S.K. Chia, D. Voduc, D. Gao, S. Leung, J. Snider et al. // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2009. – № 101. – P. 736–750.
7. Molecular portraits of human breast tumors / C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen, M. Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees et al. // *Nature*. – 2000. – № 406. – P. 747–752.
8. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies / F.M. Blows, K.E. Driver, M.K. Schmidt, A. Broeks, F.E. Leeuwen, J. Wesseling et al. // *PLoS Med.* – 2010. – № 7. – P. 279.