

## Возможности изучения субпопуляций интратуморальных лимфоцитов методом проточной цитометрии на материале кор-биопсии опухоли у больных раком молочной железы

Ф.А. Шамилов<sup>1</sup>, Я.В. Вишневская<sup>2</sup>, В.Ю. Сельчук<sup>1</sup>, Е.М. Погодина<sup>2</sup>,  
Д.И. Зернов<sup>2</sup>, Н.В. Чхиквадзе<sup>2</sup>, В.В. Тимошенко<sup>2</sup>, Д.А. Рябчиков<sup>2</sup>, Н.Н. Тупицын<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра онкологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России;

<sup>2</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контакты: Фархад Азерович Шамилов farhad8282@rambler.ru

Проведено исследование субпопуляций интратуморальных лимфоцитов, выделенных из материала кор-биопсии у больных раком молочной железы (РМЖ) ( $n = 19$ ). Использован метод многопараметровой проточной цитометрии с двумя 4-цветными комбинациями антител: CD4/CD25/CD3/CD45 и CD8/CD56/CD3/CD45. Преобладающим типом лимфоцитов в опухолевой ткани были зрелые Т-клетки (CD3<sup>+</sup>) – 88,2%, далее следовали CD4<sup>+</sup>-лимфоциты (45,1%) и Т-цитотоксические (CD8<sup>+</sup>) клетки (40,4%). Среднее содержание NK-клеток и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов было невысоким – 1,6% и 4,1% соответственно. Соотношение CD8/CD4 в 53% случаев было < 1. Пропорция CD8<sup>+</sup> клеток была более высокой в случаях умеренной и выраженной инфильтрации опухоли CD45<sup>++</sup>-лимфоцитами ( $p = 0,007$ ).

**Ключевые слова:** рак молочной железы, субпопуляции интратуморальных лимфоцитов, кор-биопсия, проточная цитометрия

### Possibilities of investigating intratumoral lymphocyte subpopulations by flow cytometry of tumor core biopsy specimens in patients with breast cancer

F.A. Shamilov<sup>1</sup>, Ya.V. Vishnevskaya<sup>2</sup>, V.Yu. Selchuk<sup>1</sup>, E.M. Pogodina<sup>2</sup>,  
D.I. Zernov<sup>2</sup>, N.V. Chkhikvadze<sup>2</sup>, V.V. Timoshenko<sup>2</sup>, D.A. Ryabchikov<sup>2</sup>, N.N. Tupitsyn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Oncology, Moscow State University of Medicine and Dentistry;

<sup>2</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Study of tumor-infiltrating lymphocyte subpopulations was performed in 19 patients with breast cancer (core biopsy material). Two probes were used in multiparameter flow cytometry: CD4/CD25/CD3/CD45 and CD8/CD56/CD3/CD45. Mean percentage of different cell types within lymphocytes (CD45<sup>++</sup> SSSC Low) was as follows: CD3 – 88.2%, CD4 – 45.1%, CD8 – 40.4%, NK (CD3-CD56<sup>+</sup>) – 1.6%, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> – 4.1%. Ratio CD8/CD4 was less than 1 in 53% of cases. In cases of prominent and moderate CD45 infiltration percentage of CD8<sup>+</sup> lymphocytes was significantly higher than in cases with low infiltration,  $p = 0.007$ .

**Key words:** breast cancer, subpopulations of tumor-infiltrating lymphocytes, core-biopsy, flow cytometry

Субпопуляционный состав интратуморальных лимфоцитов у больных раком молочной железы (РМЖ) имеет важное клиническое значение. При операбельном раке на основании этих данных возможно выделение групп пациенток с благоприятным и неблагоприятным прогнозом [1, 2, 4–6].

Это может являться основанием для расширения показаний для иммунологических исследований, их проведения на этапе диагностики по материалу кор-биопсии, так же, как это делается для морфологической верификации диагноза, определения рецепторов эстрогенов и прогестерона, экспрессии HER2 и пролиферативного индекса Ki-67.

Роль изучения интратуморальных лимфоцитов при РМЖ была подтверждена иммуногистохимией и проточной цитометрией на материале хирургически уда-

ленной опухоли [1–6]. Исследования кор-биопсии не нашли широкого применения, так как считается, что материала, получаемого при кор-биопсии, недостаточно для иммунологического анализа. Вместе с тем, именно данные, получаемые при кор-биопсии, могли бы быть использованы для планирования и проведения лечебных мероприятий (иммунотерапия, химиотерапия (ХТ)) в неоадьювантном режиме у больных с неблагоприятным прогнозом.

В работе Н.А. Субботиной и соавт. [3] показано, что иммуногистохимический анализ материала кор-биопсии с использованием люминесцентной микроскопии позволяет в полной мере охарактеризовать субпопуляционный состав интратуморальных лимфоцитов. Иммуногистохимическая оценка позволяет оценить уровни интратуморальных лимфоцитов лишь

полуколичественно, что является менее точным при оценке динамики изменений после проведенного лечения.

Метод многопараметровой проточной цитометрии дает возможность оценить экспрессию целого ряда маркеров на уровне одной клетки, что открывает перспективы исследований даже при получении очень маленьких образцов опухолевой ткани.

**Целью настоящей работы** явилась оценка возможности изучения субпопуляционного состава интраутеральных лимфоцитов у больных РМЖ на материале кор-биопсии.

### Материалы и методы

Исследование проведено среди больных операбельным РМЖ, у которых в процессе комплексного обследования с целью верификации диагноза проводилась кор-биопсия опухолевой ткани ( $n = 19$ ). Диагноз РМЖ во всех случаях был подтвержден морфологически.

Для иммунологических исследований клетки опухоли дезагрегировали с использованием скальпеля и иглы, в ряде случаев применяли аппарат «Medimashin» (Becton Dickinson, США), специально разработанный для выделения лимфоцитов из опухолевой ткани.

Окраску клеток проводили методом прямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител, меченых флуорохромами. Количество проб, изучаемых иммунологически, было сведено до 2, учитывая крайне малое количество материала кор-биопсии:

- 1) CD4-FITC/CD25-PE/CD3-ECD/CD45-PE. Cy5;
- 2) CD8/FITC/CD56-PE/CD3-ECD/CD45-PE. Cy5.

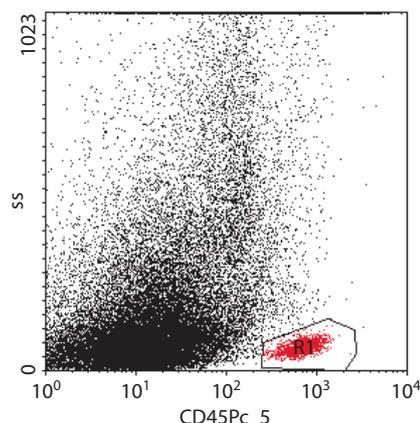
Эти комбинации антител позволяли оценить общий уровень инфильтрации опухоли лимфоцитами, пропорцию Т-клеток среди лимфоцитов, субпопуляции CD4- и CD8-клеток, активационные маркеры (CD25) и, в частности, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-регуляторные клетки, TNK-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) и естественные киллеры (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>).

Сбор клеток проводили на проточном цитометре EPICS XL MCL, общее количество набираемых событий – от 75 000 до 500 000.

Анализ цитометрических данных проводили с использованием программ MDI или FCS (версия 3). При статистической обработке данных использовали программу SPSS.

### Результаты и обсуждение

В большинстве случаев полученного материала кор-биопсии хватало для окраски обеих проб. Уровень лимфоидной инфильтрации опухолевой ткани колебался от незначительного до выраженного. На рис. 1 представлена умеренная лимфоидная инфильтрация ткани РМЖ лимфоцитами. Анализ субпопуляций лимфоцитов проводили в гейте R1.



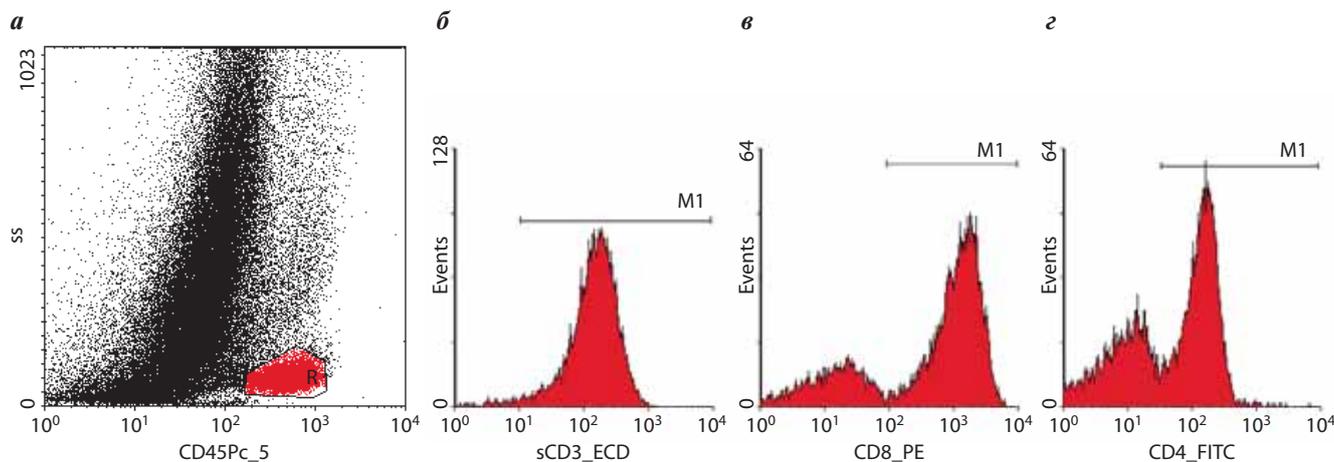
**Рис. 1.** Умеренная инфильтрация РМЖ лимфоцитами (клетками с яркой экспрессией CD45/ось X и низкими уровнями бокового светорассеяния SSC/ось Y). В представленном случае общее количество накопленных при цитометрии событий – 75 453, из них лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>SSC<sup>Low</sup>) – 1216 (1,61%)

Количественная характеристика субпопуляций лимфоцитов по материалу кор-биопсии представлена в табл. 1.

В материале кор-биопсии больных РМЖ преобладали зрелые Т-клетки (CD3<sup>+</sup>), количество которых достигало 95% от числа лимфоцитов, в среднем  $88,2 \pm 1,6\%$ . Количество CD4-лимфоцитов незначительно преобладало над количеством цитотоксических лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) – в среднем 45,1% и 40,4% соответственно. Соотношение CD8/CD4 в целом по группе составило 0,96. Уровень клеток естественных киллеров (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) был, как правило, незначительным и не превышал 4,12%. Т-регулятор-

**Таблица 1.** Субпопуляции лимфоцитов ткани РМЖ (кор-биопсийный материал)

Субпопуляция (CD)	Описательные статистики				
	n	% клеток			
		min	max	среднее	стандартная ошибка среднего
CD3	18	72,90	95,0	88,0578	1,58944
CD8	17	25,38	57,38	40,3612	2,15794
CD4	18	24,49	60,82	45,1067	2,36914
CD8/CD4	17	0,43	1,43	0,9565	0,07670
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	14	0,58	9,13	4,0943	0,77425
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	17	0,59	28,00	4,4676	1,56628
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	17	0,00	4,12	1,5929	0,34319
% CD45 <sup>++</sup> SSC <sup>Low</sup>	19	0,10	9,54	2,1121	0,67986



**Рис. 2.** Выраженная инфильтрация опухоли CD8-лимфоцитами, соотношение CD8/CD4 = 1,19: а – уровень общей лимфоцитарной инфильтрации очень высокий, в гейте R1 – 9,2% клеток от общего числа событий (158 533); б – большинство лимфоцитов представлены зрелыми Т-клетками (91%); в – среди tumor-инфильтрирующих лимфоцитов преобладают CD8<sup>+</sup>-клетки (51%); з – содержание CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов – 43%

ные клетки находились в диапазоне от 0,58 до 9,13%, в среднем – 4,1 ± 0,8%.

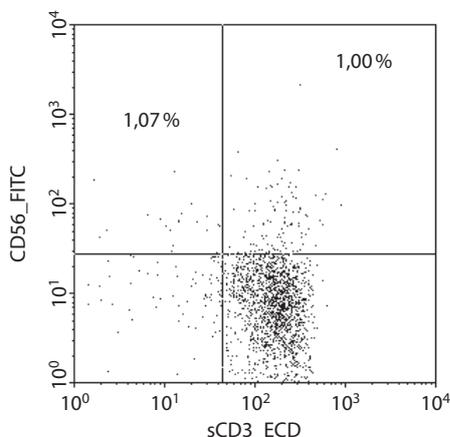
Эти данные подтверждают результаты предшествующих исследований относительно главенствующей роли Т-лимфоцитарного звена иммунитета в инфильтрации опухолевой ткани РМЖ [1–4]. Впервые количественно подтверждено, что среди tumor-инфильтрирующих лимфоцитов CD4-клетки (44,1%) преобладают над цитотоксическими CD8<sup>+</sup>-лимфоцитами (40,4%), и соотношение CD8/CD4 не достигает единицы (0,96). Учитывая тот факт, что преобладание CD4-клеток является фактором неблагоприятного прогноза [5, 6], можно считать обоснованным рассмотрение возможности разработки методов повышения уровней CD8-лимфоцитов и соотношения CD8/CD4 в опухолевой ткани больных РМЖ.

Этот вопрос необходимо рассматривать индивидуально, учитывая особенности субпопуляционного со-

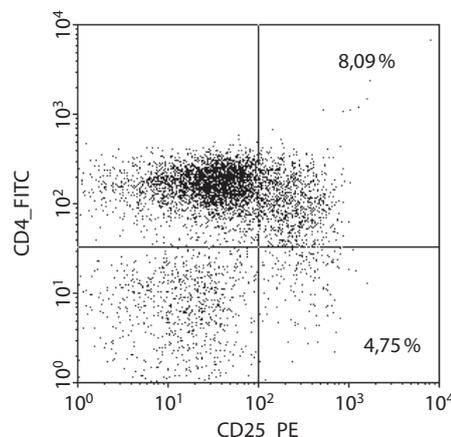
става лимфоцитов в ткани кор-биопсии РМЖ. Действительно, у 9 из 15 пациенток, у которых было изучено соотношение CD8/CD4 в опухолевой ткани, значение индекса составляло < 1 (min 0,4), однако в 8 случаях Т-цитотоксические лимфоциты преобладали – от 1,14 до 1,4. Пример высокого содержания CD8-лимфоцитов представлен на рис. 2.

Содержание ТНК-клеток и естественных киллеров было, как правило, невысоким. На рис. 3 представлены эти субпопуляции интратуморальных лимфоцитов.

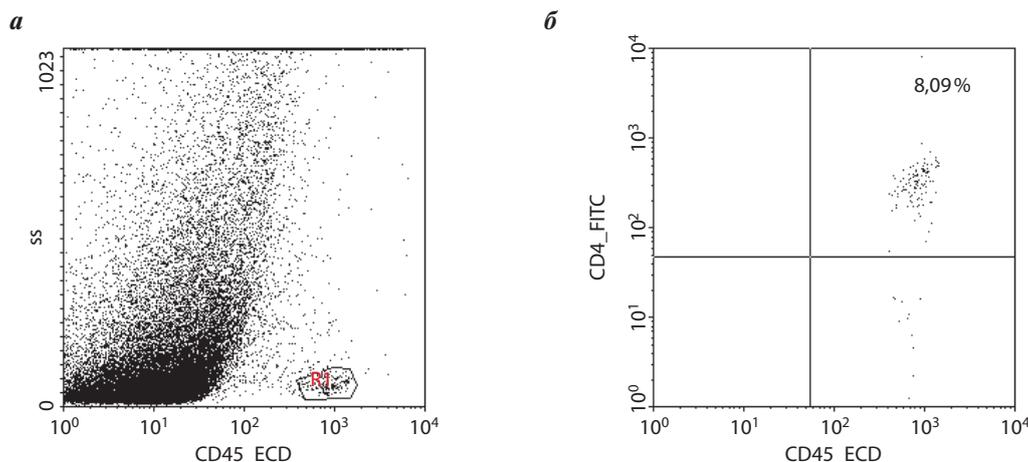
Важное значение в исследованиях противоопухолевого иммунитета имеет анализ Т-регуляторных клеток – субпопуляции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов, способной подавлять иммунный ответ на опухолевые антигены. Пример выраженной пропорции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> интратуморальных лимфоцитов в материале кор-биопсии РМЖ представлен на рис. 4.



**Рис. 3.** Субпопуляции ТНК-клеток и естественных киллеров в ткани РМЖ (материал кор-биопсии). Анализ в гейте CD45<sup>+</sup>/SSC<sup>Low</sup> лимфоцитов (выделение гейта см. на рис. 1). Отчетливо видны субпопуляция ТНК-клеток (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) – 1,0% и субпопуляция естественных киллеров (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) – 1,07%



**Рис. 4.** Экспрессия CD25 на CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах и на CD4-негативных Т-клетках. Анализ в гейте CD45<sup>+</sup>/SSC<sup>Low</sup> CD3-позитивных лимфоцитов. Количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов – 8,09%



**Рис. 5.** Низкое содержание опухолеинфильтрирующих лейкоцитов в материале кор-биопсии РМЖ (а), существенное преобладание  $CD4^+$ -лимфоцитов (б). Содержание клеток в гейте лимфоцитов составило всего 0,34% от общего числа событий. Более 90% из них представлены Т-клетками ( $CD3^+$ ), из которых 68% –  $CD4^+$ -клетки, соотношение  $CD8/CD4 \approx 0,5$

Как видно на рис. 4, уровни экспрессии  $CD25$  на  $CD4^+$  Т-клетках примерно такие же, как и на  $CD4^-$  негативных Т-клетках, что не позволяет отнести их

однозначно к регуляторным Т-клеткам. Подобный фенотип более характерен для активированных  $CD4^+$ -лимфоцитов (активированных Т-хелперов).

**Таблица 2.** Процентное содержание субпопуляций клеток в пределах интратуморальных  $CD45^{+}$ -лимфоцитов в зависимости от общего уровня лимфоидной инфильтрации опухолевой ткани (материал кор-биопсии)

Популяция клеток (CD)	Уровень инфильтрации	n	Средний процент	Стандартная ошибка среднего	p
CD3	0,00*	7	86,8729	6,63905	0,57
	1,00	11	88,8118	7,01793	
CD8	0,00	6	32,9833	2,68878	0,007
	1,00	11	44,3855	8,51905	
CD4	0,00	7	43,8943	12,71022	0,7
	1,00	11	45,8782	8,55217	
CD8/CD4	0,00	6	0,8500	0,33009	0,32
	1,00	11	1,0145	0,30826	
$CD4^+CD25^+$	0,00	5	5,2640	2,93215	0,28
	1,00	9	3,4444	2,82996	
$CD3^+CD56^+$	0,00	6	8,6467	9,93105	0,045
	1,00	11	2,1882	1,10516	
$CD3^-CD56^+$	0,00	6	1,7150	1,70007	0,81
	1,00	11	1,5264	1,32085	

\*0 – низкие уровни инфильтрации, 1 – умеренная и высокая инфильтрация.

Наибольший интерес представляют случаи РМЖ, которые на основании субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов могут быть расценены как прогностически неблагоприятные. Подобное наблюдение с минимальной инфильтрацией опухоли лимфоцитами и низким содержанием Т-цитотоксических ( $CD8^+$ ) клеток представлено на рис. 5.

Согласно современным представлениям, больные с выраженным преобладанием  $CD4^+$ -лимфоцитов в опухолевой ткани характеризуются неблагоприятным прогнозом [5, 6]. Отбор этих случаев на этапе диагностики (кор-биопсии) позволяет планировать лечебные мероприятия, например, иммунотерапевтические в неoadъювантном режиме.

Таким образом, материала кор-биопсии в большинстве случаев достаточно для оценки субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов. Для минимизации количества необходимого для исследования материала необходимо использовать многопараметровую (4-цветную) проточную цитометрию, позволяющую количественно оценить как уровни инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами, так и субпопуляции наиболее значимых эффекторных клеток противоопухолевого иммунитета: зрелые Т-лимфоциты, Т-хелперы, активированные Т-лимфоциты, Т-регуляторные клетки, Т-цитотоксические лимфоциты, НКТ-клетки и НК-клетки.

На представленном нами материале уровни инфильтрации РМЖ лимфоцитами можно разделить на низкие ( $< 0,5\%$  лимфоцитов от общего числа событий) – 7 из 19 больных (36,8%), умеренные (0,5–2%) – 8/19 (42,1%) и высокие ( $> 2\%$ ) – 4/19 (21,1%). Преобладают случаи с низкой и умеренной лимфоидной инфильтрацией (79%).

В составе интратуморальных лимфоцитов РМЖ до 95 % составляют зрелые Т-клетки (CD3<sup>+</sup>). Их субпопуляционный состав характеризуется преобладанием Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) над Т-цитотоксическими лимфоцитами (CD8<sup>+</sup>), соотношение CD8/CD4 < 1 – 53 % случаев, > 1 – 47 % случаев.

При сравнении группы больных с низкими и очень низкими уровнями лимфоидной инфильтрации РМЖ с группой больных, у которых наблюдается умеренная и выраженная инфильтрация, получены интересные данные (табл. 2).

Из числа проанализированных субпопуляций интратуморальных лимфоцитов только Т-цитотоксические (CD8<sup>+</sup>) клетки имели взаимосвязь с общим уровнем лимфоидной инфильтрации. При умеренной и высокой инфильтрации процентное содержание Т-цитотоксических клеток было достоверно более высоким: 44,4 % и 33 %,  $p = 0,007$  (см. табл. 2). Это позволяет предположить, что именно CD8<sup>+</sup>-лимфоциты во многом определяют общий уровень лимфоидной инфильтрации РМЖ. Подобное заключение о существовании положительной взаимосвязи между общим

уровнем лимфоидной инфильтрации РМЖ и уровнем инфильтрации Т-цитотоксическими (CD8<sup>+</sup>) лимфоцитами было сделано ранее с использованием полуколичественного иммуногистохимического метода [1, 2], а в нашей работе получило строго количественное подтверждение. Взаимоотношения общего уровня лимфоидной инфильтрации (CD45<sup>++</sup>/SSC<sup>Low</sup>) с процентом TNK-клеток были иными: более высокое содержание TNK-клеток отмечено при низкой лимфоидной инфильтрации опухоли.

### Заключение

Представленные результаты свидетельствуют о возможности количественного исследования субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов РМЖ на материале кор-биопсии. Эти данные могут быть использованы для разработки протоколов иммунокоррекции в прогностически неблагоприятных группах. Разумеется, дальнейшие исследования необходимо проводить с учетом иммунофенотипических особенностей опухоли, в частности, молекул рецепторов, опосредующих взаимодействия с клетками иммунной системы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Иммунология гемопоеза 2009;6(1):8–51.
2. Артамонова Е.В., Огнерубов Н.А., Тупицын Н.Н., Лятегин В.П. Рак молочной железы: иммунологические факторы прогноза. Издательство Воронежского государственного университета, 2005. 240 с.
3. Субботина А.А., Лятегин В.П., Тупицын Н.Н., Ермилова В.Д., Высоцкая И.В. Роль иммунофенотипирования рака молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии. Иммунология гемопоеза 2009;6(1):52–78.
4. Тупицын Н.Н. Иммунофенотип рака молочной железы. Рак молочной железы. Под ред. Н.Е. Кушлинского, С.М. Портного, К.П. Лактионова. М.: ПАМН, 2005. С. 174–97.
5. DeNardo D.G., Drennan D.J., Rexhepaj E. et al. Leucocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. Cancer Discovery 2011;1(1):54–67.
6. Ruffel B., Au A., Rugo H.S. et al. Leucocyte composition of human breast cancer. PNAS 2012;109(8):2796–801.