

## Субпопуляции лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы

Т.А. Григорьева<sup>1</sup>, О.А. Безнос<sup>2</sup>, Н.Н. Тупицын<sup>2</sup>, И.К. Воротников<sup>2</sup>, В.Ю. Сельчук<sup>1</sup>, Д.А. Рябчиков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра онкологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 127473, Москва, ул. Десятская, 20, стр. 1;  
<sup>2</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23

**Контакты:** Татьяна Анатольевна Григорьева grigorievatatiana@bk.ru

Исследованы субпопуляции лимфоцитов костного мозга 67 больных раком молочной железы (РМЖ) и 13 пациенток с доброкачественными процессами в молочной железе. Проведены морфологическое исследование клеточного состава костного мозга и иммунологический анализ субпопуляций лимфоцитов. Выполнена сравнительная характеристика субпопуляций лимфоцитов костного мозга больных РМЖ и пациентов с доброкачественными заболеваниями молочных желез методом проточной цитометрии. В гейте зрелых лимфоцитов (CD45++) изучены субпопуляции Т-клеток (CD3), В-клеток (CD19), NK-клеток (CD56+CD3-). Среди Т-лимфоцитов (CD3+) изучены TCRγδ и TCRαβ, субпопуляции CD4, CD8, CD4+, CD25+, Т-регуляторные клетки. В пределах В-лимфоцитов (CD19+) изучены субпопуляции CD10-, CD38-, CD5-лимфоцитов. Выявлено трехкратное повышение CD5+CD38+ В-клеток у больных РМЖ в сравнении с доброкачественными образованиями. Индекс созревания эритроцитов был достоверно более высоким при РМЖ (0,96) в сравнении с доброкачественными процессами (0,92). У больных РМЖ среднее содержание плазмочитов костного мозга было более низким в сравнении с пациентками, имеющими доброкачественные образования. При сопоставлении иммунологических данных с гистологическим строением опухоли в группе больных РМЖ отмечено, что содержание CD10+ В-лимфоцитов было достоверно более высоким при инфильтративно-протоковом раке в сравнении с инфильтративно-дольковым (19,3 и 8,0 % соответственно; p = 0,024).

**Ключевые слова:** рак молочной железы, стеральная пункция, субпопуляции лимфоцитов костного мозга, проточная цитометрия, иммунологический анализ, лимфоциты

DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-2-52-55

### Lymphocyte subpopulations of bone marrow of breast cancer patients

T.A. Grigorieva<sup>1</sup>, O.A. Beznos<sup>2</sup>, N.N. Tupitsyn<sup>2</sup>, I.K. Vorotnikov<sup>2</sup>, V. Yu. Selchuk<sup>1</sup>, D.A. Ryabchikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Oncology, A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of Russia; 20 Bldg. 1 Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russia;

<sup>2</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

We have studied bone marrow lymphocytes subpopulations in 67 patients with breast cancer and 13 patients with benign processes in the mammary gland. Morphological study of the cellular composition of the bone marrow and immunological analysis of lymphocyte subpopulations have been done. Comparative characterization of lymphocyte subpopulations in the bone marrow of patients with breast cancer and benign breast diseases was done by flow cytometry. The gate of Mature lymphocytes (CD45++) studied subpopulations of T cells (CD3), b cells (CD19), NK cells (CD56+CD3-). Among T lymphocytes (CD3+) was studied TCRγδ and TCRαβ cells, a subpopulation of CD4, CD8, CD4+, CD25+ T-regulatory cells. Within B-lymphocytes (CD19+) was studied subpopulations CD10, CD38, CD5 lymphocytes. We revealed a significant increase of CD5+, CD38+ B-cells in patients with breast cancer compared to benign tumors. Index of maturation of erythrocytes was significantly higher in BC 0.96 in comparison with benign processes 0.92. When comparing immunological data with histological structure of the tumor in the group of breast cancer patients, it was noted that the percent of CD10+ B-lymphocytes was significantly higher in infiltrative ductal cancer in comparison to infiltrative lobular carcinoma (19.3 and 8.0 % accordingly; p = 0.024).

**Key words:** breast cancer, sternal puncture, lymphocyte subpopulations of bone marrow, flow cytometry, immunological analysis, lymphocytes

#### Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является самой распространенной злокачественной опухолью среди женщин в России и в большинстве стран мира. В 2010 г. РМЖ устойчиво занимал 1-е место, составляя при этом 20,0 % среди всех злокачественных новообразований. Заболеваемость РМЖ с каждым годом не-

клонно растет на 1–2 %. Ежегодно в мире регистрируют более 1 млн новых случаев. Показатель смертности за последние 10 лет составил 15,02 % [1–3].

Особое внимание в последние годы уделяется более точному стадированию заболевания, а также совершенствованию методов лекарственной терапии РМЖ. Изучение биологических характеристик забо-

лечения может быть полезным при выборе эффективного вида лекарственной терапии.

Современные технологии и успехи скрининговых программ привели к значительному увеличению числа больных РМЖ, выявляемых на тех стадиях, когда размеры первичной опухоли очень малы и отсутствуют метастазы в регионарные лимфатические узлы. Данная категория пациенток имеет весьма благоприятный прогноз, однако в действительности примерно у трети из них впоследствии развиваются отдаленные метастазы [6].

Анализ большинства проведенных исследований показывает, что у операбельных больных РМЖ обнаружение микрометастазов в костном мозге коррелирует с ранним рецидивом и меньшей продолжительностью жизни, и риск рецидива повышается с увеличением количества обнаруженных в костном мозге эпителиальных клеток [7].

В настоящее время в ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» проведено 3 крупных исследования по изучению гемопоэза и субпопуляционного состава зрелых лимфоцитов костного мозга при опухолевом поражении.

В работе О.П. Колбацкой и Н.Н. Тупицына установлено, что острые лейкозы у взрослых характеризуются специфическими для каждой нозологической формы изменениями субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга при диагностике заболевания. Выявлены достоверные различия субпопуляционного состава эффекторов Т-лимфоцитов в пределах как нозологических вариантов острых лейкозов (острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ)), так и морфоцитохимических вариантов ОМЛ и иммунофенотипических вариантов ОЛЛ, а также в зависимости от коэкспрессии на кластерах различных антигенов [8].

В работе Т.В. Горбуновой и соавт. выявлено увеличение субпопуляции активированных Т-клеток и Т-цитотоксических клеток, а также увеличение пропорции зрелых Т-клеток, экспрессирующих на мембране TCR. Значимые различия отмечены для Т-клеточной субпопуляции Leu8, клетки этого типа преобладали при наличии метастазов в регионарные лимфатические узлы. При анализе отдаленного метастазирования отмечено резкое снижение NK-клеток и TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов. Результаты работы свидетельствуют о важной роли ряда особых субпопуляций Т-клеток (Leu8), естественных киллеров и TCR-клеток в процессах лимфогенного и гематогенного метастазирования у детей с рабдомиосаркомой [9, 10].

В работе Е.Г. Тимониной и соавт. показаны изменения со стороны эритроидного ростка гемопоэза при плоскоклеточном раке головы и шеи [13].

По поводу патологии молочных желез подобные вопросы еще не разработаны, и наше исследование

можно отнести к числу перспективных направлений в области поиска механизмов активации противоопухолевой иммунной защиты, препятствующей развитию метастазов и диссеминированных в костном мозге опухолевых клеток.

**Цель нашего исследования** — провести сравнительную характеристику субпопуляций лимфоцитов костного мозга пациенток с РМЖ и доброкачественными заболеваниями молочных желез.

Задачи исследования:

1) изучить относительное и абсолютное содержание Т-, В- и NK-клеток в костном мозге больных РМЖ;

2) изучить относительное и абсолютное содержание Т-, В- и NK-клеток в костном мозге пациенток с доброкачественными заболеваниями молочных желез;

3) сравнить относительное и абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов костного мозга больных РМЖ и пациенток с доброкачественными заболеваниями молочных желез;

4) изучить показатели гемопоэза (миелограмма) у больных РМЖ и у пациенток с доброкачественными заболеваниями молочных желез.

### Материалы и методы

В исследование вошли 80 операбельных больных, находившихся на обследовании и лечении в РОНЦ им. Н.Н. Блохина, из них 67 пациенток с РМЖ и 13 пациенток с доброкачественными заболеваниями молочных желез.

У всех больных диагноз был установлен впервые без предшествующего химиолучевого лечения. Больным было проведено стандартное общее клиническое обследование, включающее современные методы диагностики онкологических заболеваний. Диагноз во всех случаях был верифицирован на основании морфологического или иммуногистохимического исследования материала первичной опухоли в отделе патологической анатомии опухолей человека. Наиболее частыми гистологическими вариантами были инфильтративный протоковый рак (61 %) и инфильтративный дольковый рак (24 %), реже встречались другие формы рака (15 %).

Распределение больных в зависимости от стадии заболевания РМЖ представлено на рисунке.

Больные предварительно подписывали информированное согласие на пункцию костного мозга. Забор костного мозга (примерно 1,0 мл) проводили из грудины под общей анестезией во время хирургического вмешательства на молочной железе.

Всем больным проведено морфологическое и иммунологическое исследование субпопуляций лимфоцитов костного мозга в лаборатории гемопоэза РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Оценка наличия микрометастазов в костном мозге выполнялась путем проточной цито-



Распределение пациенток с РМЖ в зависимости от стадии заболевания

метрии на приборе Attune Acoustic Focusing Cytometer, обладающем высокой скоростью сбора, акустической фокусировкой и точностью до 1 опухолевой клетки на 10 млн клеток [12].

При анализе микрометастазов использовались моноклональные антитела. Исследование субпопуляций лимфоцитов костного мозга проведено методом 3-цветной проточной цитометрии. В гейте зрелых лимфоцитов (CD45++) изучены субпопуляции Т-клеток (CD3), В-клеток (CD19), NK-клеток (CD56+CD3- или CD16+CD3-). Среди Т-лимфоцитов (CD3+) изучены TCR $\gamma\delta$  и TCR $\alpha\beta$ , субпопуляции CD4, CD8, CD4+, CD25+, Т-регуляторные клетки; в пределах В-лимфоцитов (CD19+) – субпопуляции CD10-, CD38-, CD5-лимфоцитов.

Статистический анализ данных проведен с использованием программы SPSS.

### Результаты и обсуждение

При изучении показателей гемопоэза нами не установлено существенных различий в клеточном составе миелограммы у больных РМЖ по сравнению с пациентками, имеющими доброкачественные процессы в молочной железе. Несколько более высокие уровни плазмочитов отмечены у пациенток с доброкачественными процессами в сравнении с больными РМЖ:  $0,923 \pm 0,18$  и  $0,619 \pm 0,06$  % соответственно;  $p = 0,06$ . В более ранней работе О.В. Крохиной и соавт. (2007) были установлены определенные особенности плазмочитов костного мозга при РМЖ (наличие кластеров плазматических клеток), в особенности при наличии микрометастазов [6].

У больных РМЖ отмечен значительно более высокий индекс созревания эритроидных клеток костного мозга в сравнении с женщинами, имеющими доброкачественные процессы в молочной железе: в среднем  $0,9606 \pm 0,006$  и  $0,92 \pm 0,02$  соответственно;  $p = 0,037$ . Эти данные во многом соотносятся с данными Е.Г. Тимониной и соавт. (2009), установившей ускоренное созревание эритрокариоцитов у больных плоскокле-

точным раком головы и шеи [13]. В работе также установлены определенные иммунологические связи. У больных РМЖ в сравнении с нормой (неопухолевая патология) имели место достоверно более высокие уровни CD5+CD38+ В-лимфоцитов (CD19+) врожденного иммунитета:  $11,3 \pm 2,0$  и  $3,1 \pm 0,8$  %;  $p = 0,001$ .

Другой показатель клеточного иммунитета, достоверно отличавшийся в сторону увеличения при РМЖ в сравнении с нормой, также касался врожденного иммунитета. Уровни NK-клеток CD16+CD3- больных РМЖ составили в среднем  $14,97 \pm 1,6$  %, а при доброкачественных процессах –  $8,9 \pm 2,2$  %;  $p = 0,046$ . Вместе с тем достоверных различий по уровням CD56+CD3- NK-клеток установлено не было ( $p > 0,05$ ).

Интересные данные получены при анализе иммунологических сопоставлений с морфологическим вариантом опухоли. При сопоставлении иммунологических данных с гистологическим строением опухоли в группе с РМЖ отмечено, что содержание CD10+ В-лимфоцитов было достоверно более высоким при инфильтративно-протоковом раке в сравнении с инфильтративно-дольковым раком ( $16,3 \pm 2,97$  и  $6,98 \pm 2,68$  % соответственно;  $p = 0,029$ ).

В литературе имеются отдельные указания на существенные различия в субпопуляционном составе лимфоцитов костного мозга у больных РМЖ в сравнении с нормой.

В работе М. Feuerer et al. (2001) были описаны различия по Т-клеткам памяти CD45RO (повышение) и по уровням NK-клеток (снижение; оценка только по маркеру CD56) у пациенток с РМЖ и нормой [4]. В нашей работе NK-клетки были идентифицированы как CD3-негативные лимфоциты, экспрессирующие антиген CD16+, и эта популяция у больных РМЖ была достоверно более высокой.

В работе Е.Ф. Solomayer et al. сравнили субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга доноров и больных РМЖ до лечения, после химиотерапии и гормонотерапии [5].

У больных РМЖ отмечалось снижение Т-клеток (CD3+) в сравнении с нормой в костном мозге:  $30,6$  % против  $40,8$  % [5]. Мы подобной закономерности не отметили: уровни CD3+-лимфоцитов при раке и доброкачественных процессах составляли по  $58$  %.

Субпопуляции В-лимфоцитов ранее не изучались. Нами выявлено трехкратное повышение CD5+CD38+ В-клеток у больных РМЖ в сравнении с неопухолевой патологией.

При изучении гемопоэза единственным показателем, достоверно различавшимся при РМЖ и неопухолевых процессах, был индекс созревания эритрокариоцитов. Этот показатель нуждается в дополнительном изучении.

В настоящее время нами проводится сопоставление полученных иммунологических данных с клиническими характеристиками образований по следую-

шим параметрам: размер опухоли, вовлечение регионарных лимфатических узлов, данные рентгенодиагностических исследований.

Полученные нами предварительные данные указывают на существование определенных различий в субпопуляционном составе лимфоцитов костного мозга у больных РМЖ и здоровых женщин: повышены НК-клетки, CD5+CD38+ В-клетки. Увеличен индекс созревания эритроцитов. Уровни CD10+ В-лимфоидных предшествен-

ников достоверно выше при инфильтративном протоковом раке в сравнении с инфильтративным дольковым раком.

Следовательно, в отличие от предыдущих работ нами установлены интересные, перспективные для изучения взаимосвязи с В-клеточным звеном иммунитета, в частности с В-предшественниками и В-клетками врожденного иммунитета CD5+. Дальнейшие исследования В-клеток костного мозга представляются, на наш взгляд, целесообразными.

## ЛИТЕРАТУРА

1. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>.
2. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2010 г. Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель. М., 2012. [Statistics of malignant neoplasms in Russia and CIS countries in 2010. Ed. by M.I. Davydov, E.M. Axel. Moscow, 2012. (In Russ.)].
3. Autier P., Boniol M., Gavin A., Vatten L.J. Breast cancer mortality in neighbouring European countries with different levels of screening but similar access to treatment: trend analysis of WHO mortality database. *BMJ* 2011;343:d4411.
4. Feuerer M., Rocha M., Bai L. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *Int J Cancer* 2001;92(1):96–105.
5. Solomayer E.F., Feuerer M., Bai L. et al. Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analysed in the bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(1):174–80.
6. Крохина О.В., Летагин В.П., Тупицын Н.Н. Иммуноцитологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг. *Иммунология гемопоеза* 2007;4(2):116–31. [Krokhina O.V., Letyagin V.P., Tupitsyn N.N. Immunocytological diagnosis of breast cancer micrometastases in bone marrow. *Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology* 2007;4(2):116–31. (In Russ.)].
7. Benou I.H., Elst H., Van der Auwera I. et al. Real-time RT-PCR correlates with immunocytochemistry for the detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2004;91(10):1813–20.
8. Колбацкая О.П., Тупицын Н.Н. Субпопуляция лимфоцитов костного мозга у больных острыми лейкозами в период диагностики заболевания. *Иммунология* 2012;33(2):77–82. [Kolbatskaya O.P., Tupitsyn N.N. Lymphocyte subpopulation in bone marrow of patients with acute leukemia during the diagnostics of the disease. *Immunologiya = Immunology* 2012;33(2):77–82. (In Russ.)]. Горбунова Т.В., Поляков В.Г., Серебрякова И.Н. и др. Сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга у детей при мелко-клеточных саркомах. *Иммунология* 2012;33(1):37–44. [Gorbunova T.V., Polyakov V.G., Serebryakova I.N. et al. Comparative analysis of lymphocyte subpopulation composition in bone marrow of children with small-cell sarcomas. *Immunologiya = Immunology* 2012;33(1):37–44. (In Russ.)].
9. Дейчман Г.И., Кашкина Л.М., Ключарева Т.Е. и др. Влияние клеток костного мозга, селезенки и перитонеального экссудата на метастазирование опухолевых клеток в легкие сибирских хомячков. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1982;XdV(10):102–5. [Deichman G.I., Kashkina L.M., Klyuchareva T.E. et al. Effect of bone marrow, spleen, and peritoneal exudate cells on tumor cells metastasis in the lungs of siberian hamster. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1982;XdV(10):102–5. (In Russ.)].
10. Френкель М.А. Исследование костного мозга в онкологии. *Иммунология гемопоеза* 2014;(1–2):18–39. [Frenkel M.A. Bone marrow studies in oncology. *Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology* 2014;(1–2):18–39. (In Russ.)].
11. Давыдов М.И., Тупицын Н.Н., Григорьева Т.А. и др. Метод проточной цитометрии в оценке минимального поражения костного мозга у больных раком молочной железы. *Иммунология гемопоеза* 2014;(1–2):8–17. [Davydov M.I., Tupitsyn N.N., Grigoriyeva T.A. et al. Flow cytometry method in assessing the minimum damage of bone marrow of patients with breast cancer. *Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology* 2014;(1–2):8–17. (In Russ.)].
12. Тимонина Е.Г., Френкель М.А., Колбацкая О.П., Подвязников С.О. Характеристика гемопоеза у больных плоскоклеточным раком головы и шеи. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина* 2009;20(3):75–81. [Timonina E.G., Frenkel M.A., Kolbatskaya O.P., Podvyaznikov S.O. Hematopoiesis characteristics of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Vestnik RONC im. N.N. Blohina = Herald of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center* 2009;20(3):75–81. (In Russ.)].