

Взаимосвязь субпопуляций интратуморальных лимфоцитов с клиническими и патоморфологическими особенностями рака молочной железы

О.А. Безнос¹, Д.А. Буров², В.Ю. Сельчук^{1, 2}, И.К. Воротников²,
В.В. Тимошенко¹, Т.А. Григорьева², Я.В. Вишневская¹, Н.Н. Тупицын¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23;

²ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России;
Россия, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

Контакты: Ольга Алексеевна Безнос beznos.olga@gmail.com

Уровни интратуморальных лимфоцитов имеют прямую взаимосвязь с клиническими, морфологическими и биологическими характеристиками опухоли. Уровни CD4⁺ лимфоцитов нарастают по мере увеличения размера опухоли. Вместе с тем содержание интратуморальных CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов является максимальным при опухолях малого размера. При отсутствии метастазов рака молочной железы в регионарных лимфатических узлах отмечается более высокое содержание активированных (HLA-DR⁺) интратуморальных Т-лимфоцитов (CD3, CD4, CD8), что отражается на более высоких уровнях HLA-DR⁺CD45⁺ лимфоцитов у больных с отсутствием метастазов в сравнении с теми, у которых метастазы обнаружены. При II и III степенях злокачественности рака молочной железы процент опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов был достоверно выше, чем при I степени. Содержание интратуморальных лимфоцитов, а также активированных Т-клеток (CD3) и Т-хелперов (CD4) выше при I стадии рака молочной железы в сравнении со II и III стадиями. Количество интратуморальных CD3⁺ Т-лимфоцитов и CD8⁺ клеток было достоверно более высоким при опухолях с низким уровнем Ki-67⁺ пролиферирующих клеток. Достоверно более высокое содержание активированных Т-клеток и активированных CD4⁺ лимфоцитов отмечено в HER-2/neu-отрицательных опухолях. При статусе HER-2/neu 2–3 балла наблюдается достоверно более высокое содержание CD4⁺CD3⁺ Т-лимфоцитов в сравнении с больными с отрицательным статусом. При инфильтративном протоковом раке выявлены достоверно более высокие уровни инфильтрации опухоли лимфоцитами, активированными Т-клетками и активированными Т-киллерами CD3⁺CD8⁺ в сравнении с инфильтративным дольковым раком. При люминальном А подтипе уровни инфильтрации опухоли лимфоцитами были в 5 раз более высокими, чем при люминальном В (10,5 и 2,2 % соответственно). Вместе с тем люминальный В подтип характеризовался достоверно более высокой инфильтрацией опухоли Т-лимфоцитами (81 и 70 %).

Ключевые слова: субпопуляции интратуморальных лимфоцитов, рак молочной железы

DOI: 10.17650/1994-4098-2016-12-2-13-17

Interrelation of tumor infiltrating lymphocyte subpopulations with clinical and pathomorphological features of a breast cancer

O.A. Beznos¹, D.A. Burov², V.Yu. Sel'chuk^{1, 2}, I.K. Vorotnikov²,
V.V. Timoshenko¹, T.A. Grigor'eva², Ya.V. Vishnevskaya¹, N.N. Tupitsyn¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²A.I. Evdokimov Moscow State Medical and Stomatological University, Ministry of Health of Russia;
Build 1, 20 Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russia

Levels of intratumoral lymphocytes have direct interrelations with clinical, morphological and biological characteristics of tumor. Rates of CD4⁺ lymphocytes rise in a process of increase of tumor size. At the same time, content of intratumoral CD4⁺CD25⁺ lymphocytes is maximal at small size tumors. In the absence of metastases of a breast cancer in the regional lymph nodes are noted a higher content of activated (HLA-DR⁺) intratumoral T-lymphocytes (CD3, CD4, CD8), which is represented in a higher levels of HLA-DR⁺CD45⁺ lymphocytes in patients with a lack of metastasis in comparison with patients, who has metastasis. In case of II and III grade of breast cancer malignancy the percent of intratumoral lymphocytes is higher, in comparison to I grade malignancy. The rate of intratumoral lymphocytes as well as activated T-cells (CD3) and T-helpers (CD4) is higher in stage I of breast cancer, then in II–III stages. The number of intratumoral CD3⁺ T-lymphocytes and CD8⁺ cells is higher in tumors with low level of Ki-67⁺ proliferated cells. Authentically higher content of activated T-cells and activated CD4⁺ lymphocytes is noted in HER-2/neu-negative cases. Higher content of CD4⁺CD3⁺ T-lymphocytes was noted in 2–3 scores of HER-2/neu than negative HER-2/neu status. At an infiltrative ductal cancer authentically higher levels of infiltration of a tumor are revealed by the lymphocytes, activated T-cells and activated T-killers CD3⁺CD8⁺. Tumor infiltration levels in luminal A cancer are 5 times higher, then in luminal B (10,5 and 2,2 % correspondingly). At the same time, luminal B subtype is characterized by higher tumor infiltration of T-lymphocytes (81 and 70 %).

Key words: tumor infiltrating lymphocyte subpopulations, breast cancer

Введение

Исследования последних лет показали, что рост большинства злокачественных опухолей сопровождается значительными нарушениями различных звеньев иммунного ответа организма [1, 2].

Универсальным механизмом ускользания рака молочной железы (РМЖ) из-под контроля Т-клеточного иммунитета является антигенное упрощение опухоли, заключающееся в утрате экспрессии молекул HLA на мембране раковых клеток по мере прогрессии [3, 4].

Снижение уровня Т-клеточной инфильтрации опухоли имеет определенную связь с регионарным метастазированием или наличием микрометастазов. Доказано, что увеличение количества интратуморальных Т-киллеров является фактором благоприятного прогноза у больных РМЖ, преимущественно без регионарного метастазирования [5]. Работами Университета Калифорнии (США) доказано, что инфильтрация опухолевой ткани РМЖ цитотоксическими лимфоцитами (CD8⁺) является фактором благоприятного прогноза, а выраженная инфильтрация CD4⁺ лимфоцитами и макрофагами, напротив, ухудшает прогноз [6, 7].

Прогностическая роль субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов при РМЖ также достаточно хорошо известна. В РОНЦ им. Н.Н. Блохина накоплен большой материал, указывающий на связь экспрессии этих молекул с уровнями Т-клеточной инфильтрации опухоли, что находит отражение в прогнозе ранних стадий РМЖ [8]. Однако точного соотношения Т-хелперного звена с экспрессией HLA-DR на раковых клетках, равно как и уровней цитотоксических (CD8) Т-лимфоцитов с экспрессией мономорфных детерминант HLA-I, не проводилось.

Современные возможности проточно-цитометрического анализа опухолевой ткани, количественной оценки экспрессии молекул HLA на опухолевых лимфоцитах и раковых клетках позволяют точно установить ассоциации активации Т-лимфоцитов с молекулами гистосовместимости. Проведение подобного анализа является ключом для интерпретации иммуногистохимических данных относительно клинической роли активации интратуморальных лимфоцитов при РМЖ.

Материалы и методы

Материалом для настоящей работы послужили данные клинического, морфологического и проточно-цитометрического исследования 58 больных РМЖ в РОНЦ им. Н.Н. Блохина в период с 2009 по 2013 г. Критерием отбора служил клинически, рентгенологически (маммографически) и морфологически верифицированный диагноз РМЖ. Возраст больных находился в пределах от 26 до 77 лет, медиана — 53 года. Распределение больных по стадиям опухолевого процесса представлено в табл. 1.

Таблица 1. Распределение больных (n = 58) по стадиям опухолевого процесса

Стадия	Число больных	
	n	%
I (T1N0M0)	14	24,1
IIA (T1N1M0, T2N0M0)	25	43,1
IIB (T2N1M0, T3N0M0)	10	17,2
IIIA (T2N2M0)	7	12,1
IIIB (T4N0M0)	2	3,5

В изучаемой группе больных преобладал инфильтрирующий протоковый рак — 42 (72,4 %) случая. Значительно реже выявляли инфильтрирующую дольковую аденокарциному — 8 (13,8 %) случаев. У 2 больных установлены редкие формы заболевания, у 6 — карцинома *in situ*.

При гистологическом исследовании у 35 (60,3 %) больных метастазов в регионарных лимфатических узлах не обнаружено (N0), в 23 (39,7 %) случаях идентифицированы метастазы в лимфатические узлы (N1—20; N2—3).

Больным проведено хирургическое вмешательство различного объема: радикальная резекция молочной железы — в 12 (20,7 %) случаях, радикальная мастэктомия с сохранением грудных мышц — в 46 (79,3 %).

При оценке рецепторного статуса в соответствии с классификацией подтипов РМЖ (St. Gallen, 2011) у 15 (25,9 %) больных установлен люминальный А подтип, у 42 (72,4 %) — люминальный В, у 1 (1,7 %) — базальноподобный (трижды негативный) рак.

Основными реактивами, применявшимися в проводимых исследованиях, были отечественные и зарубежные моноклональные антитела, перечисленные

Таблица 2. Моноклональные антитела, использованные в работе

Антигены опухолевых клеток
EpCam (CD326) — эпителиальный мембранный антиген
HLA-I — молекулы гистосовместимости I класса
HLA-II (HLA-DR) — молекулы гистосовместимости II класса
Антигены иммунокомпетентных клеток
CD45 — общелейкоцитарный антиген
CD3 — Т-клетки
CD8 — Т-киллеры
CD4 — Т-хелперы

в табл. 2. Использовали прямые конъюгаты представленных антител с флуорохромами – FITC, PE, PE-Cy5, ECD – производства фирмы Becton Dickinson (США) или Beckman Coulter (США).

Определение экспрессии молекул HLA на опухолевых клетках (EpCam⁺) выполняли методом 4-цветной проточной цитометрии на цитометре Epics-XL–MCL. Окраску проводили методом прямой иммунофлуоресценции с использованием антител, меченных флуорохромами. Количество иммунологически изучаемых проб составляло 5:

- 1-я проба: Syto16_FITC/CD326_PE/CD45_ECD/CD3_PC-5;
- 2-я проба: HLA-DR_FITC/CD326_PE/CD45_ECD/CD3_PC-5;
- 3-я проба: HLA-I_FITC/CD326_PE/CD45_ECD/CD3_PC-5;
- 4-я проба: HLA-DR_FITC/CD8_PE/CD45_ECD/CD3_PC-5;
- 5-я проба: CD4_FITC/HLA-DR_PE/CD45_ECD/CD3_PC-5.

Результаты анализировали с использованием программ WinMDI или FCS, версия 3.

Оценивали следующие иммунологические показатели интратуморальных лимфоцитов:

- общий уровень лимфоидной инфильтрации – число CD45⁺ лимфоцитов по отношению к числу ядросодержащих клеток (Syto16⁺);
- процент зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) среди лимфоцитов (CD45⁺);
- процент зрелых CD4⁺CD3⁺ Т-лимфоцитов;
- процент зрелых Т-цитотоксических лимфоцитов CD3⁺CD8⁺;
- соотношение CD4/CD8;
- процент активированных CD4⁺HLA-DR⁺ клеток;
- процент активированных CD8⁺HLA-DR⁺ клеток;
- процент эпителиальных клеток EpCam⁺, экспрессирующих молекулы HLA-I и HLA-DR.

Данные историй болезни и всех исследований были занесены в специально созданную базу данных. Критериями учета признаков являлись их наличие и степень выраженности. Вычисление и сравнение достоверности различий средних величин (с использованием критерия Стьюдента, различий по таблицам сопряженности признаков с применением критерия χ^2 , а также коэффициента корреляции Пирсона) проводили с помощью пакета программ SPSS, версия 17. Достоверными считали различия с вероятностью не менее 95 % ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При анализе полученных данных сравнивали содержание различных субпопуляций интратуморальных лимфоцитов с клиническими и патоморфологическими особенностями РМЖ.

У больных старшего возраста (≥ 50 лет) средние уровни CD4⁺ лимфоцитов были выше (48 % против 42 %), различия близки к достоверным ($p = 0,054$).

Среднее содержание интратуморальных CD4⁺CD3⁺ Т-клеток в опухолях более крупного размера (Т3–4) было достоверно более высоким, чем при опухолях меньшего размера (Т1–2), – 61,0 и 47,6 % соответственно ($p = 0,041$). При сопоставлении опухолей Т1 с Т2–4 для содержания различных субпопуляций лимфоцитов сохраняется та же тенденция, что и при сопоставлении Т1–2 с Т3–4, – более выраженная пропорция CD4⁺ Т-хелперов при более крупных опухолях (47 и 40 % соответственно; $p = 0,006$). При опухолях малого размера отмечен достоверно более высокий процент интратуморальных CD4⁺CD25⁺ клеток (13,6 и 7,3 % соответственно; $p = 0,038$).

Количество HLA-DR⁺ лимфоцитов при опухолях с отсутствием регионарных метастазов (N0) было более высоким в сравнении с опухолями, при которых имелись метастазы (N1–3), – 38 и 25 % соответственно ($p = 0,038$). HLA-DR⁺ лимфоциты являются достаточно широкой группой и включают В-клетки, активированные Т-клетки и активированные NK-клетки. Уровни всех субпопуляций активированных (HLA-DR⁺) Т-лимфоцитов (CD3, CD4, CD8) при отсутствии метастазов были повышены, что и нашло отражение в достоверных различиях по HLA-DR⁺ лимфоцитам в целом.

При II и III степенях злокачественности процент опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов в опухолях был достоверно выше, чем при I степени, – 4,5 и 2 % соответственно ($p = 0,041$). Пропорция зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), напротив, снижалась при нарастании степени злокачественности: при II и III – 76,7 %, при I – 89,4 % ($p = 0,001$). Интересные данные получены по активированным CD3⁺HLA-DR⁺ и по CD4⁺HLA-DR⁺ клеткам: их количество при I степени злокачественности было достоверно более высоким ($p = 0,000$). Однако, учитывая тот факт, что в группе сравнения больных с опухолями I степени злокачественности было всего 2 пациентки, потребуется дальнейшее накопление материала для подтверждения этих данных.

При сопоставлении III степени злокачественности с I и II степенями по уровням интратуморальных лимфоцитов подтверждено, что у больных с опухолями III степени злокачественности количество CD45⁺Syto-16⁺ клеток было достоверно более высоким (7,7 и 3,2 % соответственно; $p = 0,025$).

Содержание интратуморальных Т-клеток было выше при IA стадии РМЖ в сравнении с IB – III стадиями (84,7 и 75,7 % соответственно; $p = 0,028$). Кроме того, при IA стадии отмечены более высокие уровни активированных Т-лимфоцитов и Т-хелперов (CD3⁺ и CD4⁺) в сравнении с содержанием этих клеток при IB – III стадиях ($p = 0,02$ и $p = 0,04$ соответственно).

Те же тенденции отмечены при сопоставлении I и II–III стадий: более высокое содержание $CD3^+$ лимфоцитов и достоверно более высокое содержание $CD3^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^+$ клеток при I стадии. При сопоставлении IIВ – III стадий с более ранними оказалось, что при прогрессировании заболевания достоверно повышено количество Т-хелперных лимфоцитов ($CD4^+$) – 51 и 43 % соответственно ($p = 0,016$). При этом количество $CD25^+$ субпопуляции этих клеток при I–IIА стадиях было также высоким ($p = 0,055$). В сравнении с I и II стадиями III стадия РМЖ характеризуется дальнейшим нарастанием содержания Т-хелперов ($CD4^+CD3^+$) (61 и 47 % соответственно; $p = 0,01$) и $CD8^+$ клеток среди лимфоцитов (50,9 и 40 % соответственно; $p = 0,049$). Последнее, по-видимому, обусловлено НК-клетками, так как пропорция $CD8^+CD3^+$ клеток достоверно не увеличивается.

Количество интратуморальных Т-лимфоцитов ($CD3^+$) было достоверно более высоким при опухолях с низким уровнем пролиферирующих клеток (83 и 71 % соответственно; $p = 0,019$). Аналогично, содержание $CD8^+$ лимфоцитов было более высоким при низком уровне Ki-67⁺ клеток (47,4 и 39 % соответственно; $p = 0,018$).

При сравнении групп опухолей, различающихся по пролиферативному индексу (пороговый уровень Ki-67–15 %), выявлены достоверные различия по уровню $CD4^+$ Т-лимфоцитов ($CD3^+$), который был увеличен в группе с высоким пролиферативным индексом (45 и 49 % соответственно; $p = 0,02$).

В рецептор-положительной группе (по рецепторам эстрогенов) отмечена достоверно более низкая инфильтрация опухоли лимфоцитами (2,5 и 7,9 % соответственно; $p = 0,004$). Однако уровни Т-клеток ($CD3$) в данной группе были более высокими, различия близки к достоверным ($p = 0,085$). В случаях, положительных по экспрессии рецепторов прогестерона, наблюдалась достоверно более низкая инфильтрация опухоли лимфоцитами – 2,6 % по сравнению с 6,8 %.

Нами установлено достоверно более высокое содержание активированных Т-клеток в HER-2/neu-отрицательных (0 баллов) опухолях (28 и 11 % соответственно; $p = 0,014$). Это обусловлено популяцией

активированных $CD4^+$ лимфоцитов, содержание которых при HER-2/neu-негативных опухолях вдвое выше, чем при HER-2/neu-позитивных (21 и 12 % соответственно; $p = 0,014$). В группе пациенток со статусом HER-2/neu 2–3 балла отмечено достоверно более высокое содержание $CD4^+$ Т-лимфоцитов ($CD3^+$) в сравнении с больными с отрицательным статусом (0–1 балл) – 50 и 39 % соответственно ($p = 0,041$). Отмечено также более высокое содержание $CD8^+$ лимфоцитов при отрицательном статусе по HER-2/neu (0–1 балл) – 42 и 29 % соответственно ($p = 0,014$). Последнее обусловлено, по-видимому, НК-клетками, так как достоверного повышения $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов не выявлено.

При количественной оценке содержания интратуморальных лимфоцитов в зависимости от гистологического типа РМЖ выявлены достоверные различия. При инфильтративном протоковом раке в сравнении с инфильтративным дольковым отмечены достоверно более высокие уровни инфильтрации опухоли лимфоцитами ($p = 0,04$), активированными Т-клетками ($p = 0,009$) и активированными Т-киллерами $CD3^+CD8^+$ ($p = 0,038$).

Подтипы люминального РМЖ также достоверно различаются по уровням опухолеинфильтрирующих лимфоцитов и их субпопуляциям. Так, при люминальном А подтипе уровни инфильтрации опухоли лимфоцитами были в 5 раз более высокими, чем при люминальном В (10,5 и 2,2 % соответственно; $p = 0,026$). Вместе с тем люминальный В подтип характеризовался достоверно более высокой инфильтрацией опухоли Т-лимфоцитами (81 и 70 % соответственно; $p = 0,016$).

Заключение

Уровни интратуморальных лимфоцитов имеют прямую взаимосвязь с клиническими, морфологическими и биологическими характеристиками опухоли. Как мы уже отмечали, уровни инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами и их субпопуляциями напрямую взаимосвязаны с экспрессией молекул HLA I и II классов на опухолевых клетках. Экспрессия молекул HLA-I и HLA-II на опухолевых клетках, таким образом, находит отражение в особенностях клинического течения РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Артамонова Е.В., Огнерубов Н.А., Тупицын Н.Н. и др. Рак молочной железы: иммунологические факторы прогноза. Воронеж: Воронежский государственный университет, 2005. 240 с. [Artamonova E.V., Ognerubov N.A., Tupitsyn N.N. et al. Breast cancer: immunologic prognostic factors. Voronezh: Voronezh State University, 2005. 240 p. (In Russ.).]

2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в 2009 году. М., 2010. 281 с. [Davydov M.I., Aksel E.M. Statistics of malignant tumors in 2009. M., 2010. 281 p. (In Russ.).]

3. Aptsiauri N., Cabrera T., Mendez R. et al. Role of altered expression of HLA class I

molecules in cancer progression. Adv Exp Med Biol 2007;601:123–31.

4. Conha A., Cabrera T., Ruiz-Cabello F., Garrido F. Can the HLA phenotype be used as a prognostic factor in breast carcinomas? Int J Cancer 1991;6:146–54.

5. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике

и прогнозе рака молочной железы. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2003. 311 с.
[Artamonova E.V. The role of immunophenotyping of cancer cells in the diagnosis and prognosis of breast cancer. Abstract of a thesis for the degree of doctor of medical sciences. M., 2003. 311 p. (In Russ.)].
6. Chen J.J., Lin Y.C., Yao P.L. et al. Tumor-

associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. J Clin Oncol 2005;23(5):953–64.
7. DeNardo D.G., Barreto J.B., Andreu P. et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. Cancer Cell 2009;16(2):91–102.
8. Артамонова Е.В. Роль иммунофеноти-

пирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Иммунология гемопоеза 2009;6(1):8–51.
[Artamonova E.V. The role of immunophenotyping of cancer cells in the diagnosis and prognosis of breast cancer. Immunologiya gemopoeza = H matopoiesis Immunology 2009;6(1):8–51. (In Russ.)].