

**МЕЖДУНАРОДНЫЙ
ЖУРНАЛ ПРИКЛАДНЫХ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

**INTERNATIONAL JOURNAL
OF APPLIED AND
FUNDAMENTAL RESEARCH**

Журнал основан в 2007 году
The journal is based in 2007
ISSN 1996-3955

Импакт фактор
РИНЦ – 1,340

№ 7 2015
Часть 1
Научный журнал
SCIENTIFIC JOURNAL

Электронная версия размещается на сайте www.rae.ru

The electronic version takes places on a site www.rae.ru

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

д.м.н., профессор М.Ю. Ледванов

EDITOR

Mikhail Ledvanov (Russia)

Ответственный секретарь

к.м.н. Н.Ю. Стукова

Senior Director and Publisher

Natalia Stukova

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Курзанов А.Н. (Россия)

Романцов М.Г. (Россия)

Дивоча В. (Украина)

Кочарян Г. (Украина)

Сломский В. (Польша)

Осик Ю. (Казахстан)

EDITORIAL BOARD

Anatoly Kurzanov (Russia)

Mikhail Romantzov (Russia)

Valentina Divocha (Ukraine)

Garnik Kocharyan (Ukraine)

Wojciech Slomski (Poland)

Yuri Osik (Kazakhstan)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЖУРНАЛ ПРИКЛАДНЫХ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED
AND FUNDAMENTAL RESEARCH

Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНИТИ.

Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной справочной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals directory» в целях информирования мировой научной общественности.

Журнал представлен в ведущих библиотеках страны и является рецензируемым.

Журнал представлен в НАУЧНОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ БИБЛИОТЕКЕ (НЭБ) –
головном исполнителе проекта по созданию Российского индекса научного
цитирования (РИНЦ) и имеет импакт-фактор Российского индекса научного
цитирования (ИФ РИНЦ).

Учредители – Российская Академия Естествознания,
Европейская Академия Естествознания

123557, Москва,
ул. Пресненский вал, 28

ISSN 1996-3955

Тел. редакции – 8-(499)-704-13-41
Факс (845-2)- 47-76-77

E-mail: edition@rae.ru

Зав. редакцией Т.В. Шнуровозова
Техническое редактирование и верстка Л.М. Митронова

Подписано в печать 15.06.2015

Адрес для корреспонденции: 105037, г. Москва, а/я 47

Формат 60х90 1/8
Типография
ИД «Академия Естествознания»
440000, г. Пенза,
ул. Лермонтова, 3

Усл. печ. л. 22,75.
Тираж 500 экз.
Заказ
МЖПиФИ 2015/7

© Академия Естествознания

УДК 618.19-006.6+616-018

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В СТРОМЕ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**¹Таширева Л.А., ^{1,2}Завьялова М.В., ^{1,3}Савельева О.Е., ^{1,2}Вторушин С.В.,
^{1,2,3}Кайгородова Е.В., ^{1,3}Денисов Е.В., ^{1,2}Слонимская Е.М., ^{1,2}Перельмутер В.М.**¹ФГБНУ Томский НИИ онкологии, Томск, e-mail: tashireva@oncology.tomsk.ru;²ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск;³Научно-исследовательский Томский государственный университет, Томск

В представленном исследовании нами проводилась оценка распределения лейкоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов в строме различных морфологических структур инвазивного компонента рака молочной железы неспецифического типа, а также их связь с прогрессией опухоли. Методом иммуногистохимии определены клетки, экспрессирующие на своей мембране CD3, CD45LCA и CD8, располагающиеся вблизи структур опухоли, а также в отдалении от таковых. Была определена связь наличия определяемых клеток с лимфогенным и гематогенным метастазированием, а также рецидивированием. Было показано, что для прогнозирования развития гематогенных, но не лимфогенных метастазов, а также рецидивирования имеет значение выявление цитотоксических Т-лимфоцитов в стромальном окружении дискретно расположенных опухолевых клеток, а также в инфильтрате в отдалении от каких-либо опухолевых структур.

Ключевые слова: цитотоксические Т-лимфоциты, морфологическая гетерогенность, рак молочной железы**HETEROGENEOUS DISTRIBUTION OF CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTES IN THE STROMA OF INVASIVE BREAST CARCINOMA: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE****¹Tashireva L.A., ^{1,2}Zavyalova M.V., ^{1,3}Savelieva O.E., ^{1,2}Vtorushin S.V.,
^{1,2,3}Kaigorodova E.V., ^{1,3}Denisov E.V., ^{1,2}Slonimskaya E.M., ^{1,2}Perelmuter V.M.**¹Tomsk Cancer research institute, Tomsk, e-mail: tashireva@oncology.tomsk.ru;²Siberian state medical university, Tomsk;³Tomsk state university, Tomsk

In the present study evaluated the distribution of leukocytes and cytotoxic T-lymphocytes in the stroma of various morphological structures of the invasive component of the breast cancer (IC NST) and association with tumor progression. Determined by immunohistochemistry CD3 +, CD45LCA + and CD8 + cells which are located near the tumor entities, as well as from those in the distance. Was determined relationship between presence of cytotoxic T-lymphocytes in the microenvironment of the discrete tumor cells, as well as in infiltrate the distance of any tumor structures and hematogenous, but not lymph node metastasis, and recurrence.

Keywords: cytotoxic T-lymphocytes, morphological heterogeneity of breast cancer

Рак молочной железы не перестает занимать лидирующие позиции среди онкологических заболеваний у женщин [4]. Те или иные формы прогрессии зачастую становятся причиной гибели. В настоящее время актуальным является поиск новых подходов к прогнозированию течения этого заболевания. Известно, что ключевым фактором метастатического потенциала опухоли является состояние его микроокружения. Kohrt et al. [2005] показали, что при раке молочной железы присутствие опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в высоком CD4+/CD8+ и Th2/Th1 соотношении является плохим прогностическим показателем [6]. J. Galon et al. ввели такое понятие как Immunoscore, где в качестве прогностического признака используется определение соотношения CD3/CD8 в инвазивном крае и центре опухоли [5]. Дальнейшие исследования подтверждали показанное ранее, так, при масштабных ис-

следованиях транскриптома опухоли было продемонстрировано, что благоприятным для исхода болезни является местный Th1-ответ, ведущий к цитотоксическому уничтожению клеток опухоли [7]. Однако в литературе встречаются и противоположные данные, возможно, в силу явления внутриопухолевой гетерогенности [2], одним из проявлений которой является морфологическая гетерогенность [1]. Ранее было показано, что наличие различных морфологических структур в опухоли молочной железы имеет разное прогностическое значение и связь с вариантами прогрессии [3]. В настоящей работе было изучено наличие и распределение цитотоксических Т-лимфоцитов в строме различных структур инвазивного компонента рака молочной железы, а также проанализирована связь с прогрессией опухоли (рецидивированием, лимфогенным и гематогенным метастазированием).

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 54 больных с инвазивным раком молочной железы неспецифического типа в возрасте от 37 до 80 лет, средний возраст составил $54,9 \pm 9,7$ года. Пациенты были разделены на четыре группы: 1 – без каких-либо форм прогрессии ($n = 16$), 2 – с лимфогенным метастазированием ($n = 9$), 3 – с гематогенным метастазированием ($n = 8$), 4 – с наличием рецидива ($n = 7$). Предоперационного лечения больные не получали. Среди пациентов 59,5% имели люминальный А тип, 14,3% – люминальный В тип, 16,7% – трижды негативный тип, 9,5% – тип с гиперэкспрессией Her2neu. Всем больным проводилась операция в размере радикальной мастэктомии и секторальной резекции молочной железы. По соотношению разных молекулярно-генетических типов и вида проведенного хирургического лечения группы не различались. Образцы тканей фиксировались в 10% нейтральном формалине. Материал обрабатывался по стандартной методике и заливался в парафин. Морфологическое исследование операционного материала осуществлялось по стандартной методике с использованием светового микроскопа «CarlZeissAxio Lab.A1». Гистологический тип рака устанавливался согласно рекомендациям ВОЗ (Женева, 2012). Наличие цитотоксических Т-лимфоцитов в строме опухоли оценивали по иммуногистохимическому окрашиванию клеток, формирующих микроокружения тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных структур и дискретно расположенных групп клеток (ГК), антителами против CD45, CD3, CD8. При исследовании применяли антитела фирмы «Dako» к CD 3 (клон UCHT1, рабочее разведение 1:100), к CD8 (клон C8/144В, рабочее разведение 1:100), фирмы «Biogenex» к CD45LCA (клон PD7/26/16&2B1, RTU, мышинные). Экспрессию CD 45, CD 3, CD 8 в клетках воспалительного инфильтрата оценивали полуколичественно (0 баллов – отсутствие; 1 балл – 1–5 клеток; 2 балла – 6–20 клеток; 3 балла – более 20 клеток) вблизи каждого варианта структур паренхиматозного компонента опухоли (не далее чем на 2 диаметра малого лимфоцита), а также в строме новообразования в отдалении от паренхиматозных структур. Отдаленные результаты оценивались через 5 лет. Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ «Statistica 6.0 for Windows». Проверка на соответствие нормальному закону распределения проводилась с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для проверки гипотезы применялся критерий Краскала-Уолиса. Результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Подсчитанное в соответствии с рекомендациями J. Galon et al. соотношение CD3/CD8 оказалось выше в группе пациентов с рецидивами рака молочной железы в сравнении со случаями без прогрессии болезни. Причем результат не зависел от того проводилась ли подсчет количества соответствующих лимфоцитов в случайных полях зрения или в отдалении от опухолевых структур (соответственно: $0,911 \pm 0,946$ и $1,260 \pm 0,240$, $p = 0,003$; $0,940 \pm 0,150$

и $1,430 \pm 0,730$, $p = 0,006$). При анализе общего количества CD45LCA+ лейкоцитов и CD8+ лимфоцитов в воспалительном инфильтрате в зависимости от формы прогрессии были обнаружены достоверные различия. Показано, что наличие CD45LCA+ лейкоцитов и CD8+ лимфоцитов в инфильтрате вне зависимости от типа морфологических структур было достоверно выше в группе пациентов без рецидива ($3,05 (2,55–3,95)$ и $2,80 (2,00–3,30)$ усл.ед., соответственно) по сравнению с группой пациентов, имеющих рецидив ($2,12 (1,76–2,71)$ и $1,50 (1,20–2,22)$ усл.ед., соответственно) ($p = 0,008$ и $p = 0,027$, соответственно).

Далее, для того, чтобы определить вклад морфологической гетерогенности опухоли в выявленные различия, нами было определено содержание CD3+, CD45LCA+, CD8+ клеток и соотношение CD3/CD8 в воспалительном инфильтрате вблизи каждого из пяти типов структур инфильтративного компонента опухоли (тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных и дискретно расположенных групп клеток) в зависимости от формы прогрессии. Было обнаружено, что в группе больных без рецидива количество CD45LCA+ и CD8+ клеток в инфильтрате вокруг ГК и CD8+ клеток в инфильтрате в отдалении от опухолевых структур повышалось ($3,00 (2,00–4,00)$; $3,00 (2,50–4,00)$ и $4,00 (3,00–4,00)$ усл.ед., соответственно) по сравнению с аналогичными показателями группы больных с наличием рецидивов ($2,00 (1,00–2,00)$; $1,00 (1,00–2,00)$ и $2,00 (2,00–2,75)$ усл.ед., соответственно) ($p = 0,011$, $p = 0,019$ и $p = 0,001$, соответственно). С наличием гематогенных метастазов было ассоциировано достоверное снижение количества CD45+ и CD8+ лимфоцитов до $1,00 (1,00–2,00)$ и $1,00 (1,00–2,00)$ усл.ед., соответственно, вблизи дискретно расположенных опухолевых клеток ($p = 0,018$ и $p = 0,017$, соответственно). Соотношение CD3/CD8 вблизи разных структур не различалось в группах с наличием рецидивов или гематогенных метастазов в сравнении с контрольной группой ($p > 0,05$).

Лимфогенное метастазирование не было связано с инфильтрацией стромы CD3+, CD45LCA+ и CD8+ клетками ($p > 0,05$).

Заключение

Предлагаемое соотношение CD3/CD8 оказалось эффективным только для прогноза рецидивов. Причем такой прогноз не зависел от морфологической гетерогенности опухоли. Оказалось, что для оценки риска возникновения рецидивов и гематогенных метастазов опухоли достаточно определение CD45LCA+ или CD8+ клеток в ми-

кроокружении дискретно расположенных опухолевых клеток и CD8⁺ клеток в инфильтрате в отдалении от каких-либо опухолевых структур. Из всех типов структур инвазивного компонента опухоли, только характер иммуно-воспалительной инфильтрации вблизи дискретно расположенных опухолевых клеток оказался связанным с рецидивированием и гематогенным, но не с лимфогенным метастазированием. Выявленное снижение инфильтрации лейкоцитами и количества цитотоксических Т-лимфоцитов в строме опухоли у пациентов, имеющих рецидив или гематогенные метастазы, может свидетельствовать в пользу важной роли дискретных опухолевых клеток и иммуно-воспалительной реакции Th1-CD8 типа в развитии и торможении рецидивирования и метастазирования инвазивного рака молочной железы неспецифического типа.

Список литературы

1. Геращенко Т.С. Внутритропуховая морфологическая гетерогенность инвазивного протокового рака молочной железы: формирование и молекулярно-генетические особенности / Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Таширева Л.А., Литвяков Н.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. // Медицинский академический журнал. 2012. – Т. 12, № 4. – С. 66–68.
2. Геращенко Т.С. Внутритропуховая гетерогенность: природа и биологическое значение (обзор) / Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. // Биохимия. 2013. – Т. 78, № 11. – С. 1531–1549.
3. Перельмутер В.М. Взаимосвязь морфологической гетерогенности инфильтрирующего протокового рака молочной железы с различными формами опухолевой прогрессии / Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Савенкова О.В. // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – № 3. – С. 58–63.
4. Тамкович С.Н. Современные методы диагностики рака молочной железы / Тамкович С.Н., Войццкий В.Е., Лактионов П.П. // Биомедицинская химия. – 2014. – № 2. – С. 141–161.
5. Galon J. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force / Galon J., Pages F., Marincola F.M., et al. // J Transl Med. – 2012. – № 10. – P. 205.
6. Kohrt H.E. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer / Kohrt H.E., Nouri N., Nowels K., Johnson D., Holmes S., Lee P.P. // PLoS Med. – 2005. – № 2(9).
7. Sabatier R. A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer / Sabatier R., Finetti P., Cervera N., Lambaudie E., Esterni B., Mamessier E., Tallet A., Chabannon C., Extra J.M., Jacquemier J., Viens P., Birnbaum D., Bertucci F. // Breast Cancer Res Treat. 2011. – № 126(2). – С. 407–20. doi: 10.1007/s10549-010-0897-9.