

ИЗУЧЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ИНТРАТУМОРАЛЬНЫХ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Ф.А. Шамилов¹, И.К. Воротников², Я.В. Вишневская², В.Ю. Сельчук¹,
Е.М. Погодина², Д.И. Зернов², Н.В. Чхиквадзе², Н.Н. Тупицын²**

¹ Кафедра онкологии Московского государственного медико-стоматологического университета, Москва

² ФГБУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

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

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

POSSIBILITIES OF INTRATUMORAL LYMPHOCYTE SUBPOPULATION STUDY ON CORE BIOPSY SPECIMENS IN BREAST CANCER PATIENTS BY MULTICOLOR FLOW CYTOMETRY

**F.A. Shamilov¹, I.K. Vorotnikov², Ya.V. Vishnevskaya², V.Yu. Selchuk¹,
N.V. Tchikvadze², V.V. Timoshenko², N.N. Tupitsyn²**

² N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences,
Moscow, Russian Federation

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++ SSC^{Low}) was as follows: CD3 — 88,2%, CD4 — 45,1%, CD8 — 40,4%, NK (CD3-CD56+) — 1,6%, CD4+CD25+ — 4,1%. Ratio CD8/CD4 was less than 1 in 53% of cases. In cases of prominent and moderate CD45 infiltration percentage of CD8+ 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.

Наряду с общеизвестными клинико-морфологическими характеристиками опухоли субпопуляционный состав интратуморальных лимфоцитов у больных раком молочной железы имеет важное клиническое значение. Известно, что при операбельном раке молочной железы с учетом субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов можно выделить группы пациенток с благоприятным и неблагоприятным прогнозом [1, 2, 4, 5, 6].

В предоперационном периоде мы производили кор-биопсию опухоли для морфологической вери-

фикации диагноза, определения рецепторов эстрогенов и прогестерона, экспрессии HER2/neu и пролиферативного индекса Ki-67. Наряду с вышеуказанными клинико-морфологическими критериями, предоперационное исследование включало определение субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов.

Роль изучения интратуморальных лимфоцитов при раке молочной железы была подтверждена иммуногистохимией и проточной цитометрией на материале хирургически удаленной опухоли [1–6].

Исследования кор-биопсии не нашли широкого применения, так как считается, что материала, получаемого при кор-биопсии, недостаточно для иммунологического анализа. По нашим данным, именно получаемые результаты при кор-биопсии могут быть использованы для лечебных мероприятий (химиотерапии, иммунотерапии) в неoadъювантном режиме, что наиболее важно для пациентов с неблагоприятным прогнозом.

В работе Н.А.Субботиной и соавторов [3] показано, что иммуногистохимический анализ материала кор-биопсии с использованием люминесцентной микроскопии позволяет в полной мере охарактеризовать субпопуляционный состав интратуморальных лимфоцитов. Вместе с тем, результаты иммуногистохимического анализа позволяют определить уровни интратуморальных лимфоцитов лишь полуколичественно, что является менее точно при оценке эффективности проведенного лечения.

Нам кажется крайне важным то, что метод многопараметровой проточной цитометрии дает возможность оценить экспрессию целого ряда маркеров на уровне одной клетки, что открывает перспективы исследований даже маленьких образцов опухолевой ткани.

Цель настоящей работы — оценка возможности изучать субпопуляционный состав интратуморальных лимфоцитов у больных раком молочной железы на материале кор-биопсии.

Материалы и методы

Исследование проведено у 19 больных операбельным раком молочной железы, у которых в процессе комплексного обследования для верификации диагноза проводилась кор-биопсия опухолевой ткани. Диагноз рака молочной железы 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, меченных флуорохромами. Количество проб, изучаемых иммунологически, было сведено до двух, 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+CD25+ Т-регуляторные клетки, ТНК-лимфоциты (CD3+CD56+) и естественные киллеры (CD3-CD56+).

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. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы SPSS.

Результаты и обсуждение

Чаще всего полученного материала кор-биопсии было достаточно для окраски обеих проб. Уровень лимфоидной инфильтрации опухолевой ткани колебался от незначительного до выраженного. На рисунке 1 представлена умеренная лимфоидная инфильтрация ткани рака молочной железы лимфоцитами. Анализ субпопуляций лимфоцитов проводили в гейте R1, как показано на рисунке 1.

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

В материале кор-биопсии больных раком молочной железы преобладали зрелые Т-клетки (CD3+),

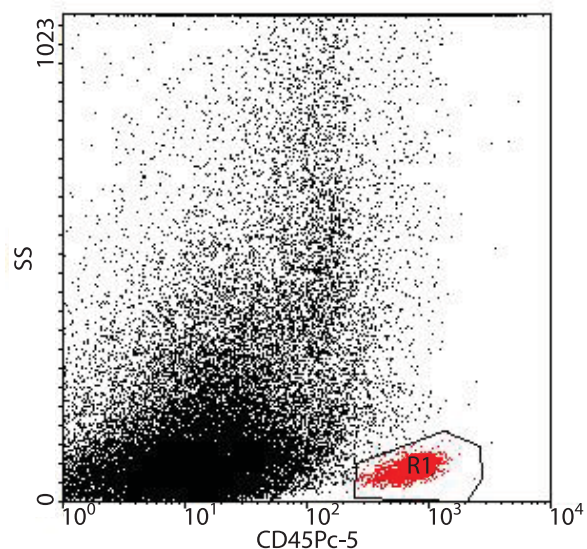


Рис. 1. Умеренная инфильтрация рака молочной железы лимфоцитами (клетками с яркой экспрессией CD45 /ось X/ и низкими уровнями бокового светорассеяния SSC /ось Y/). В представленном случае общее количество накопленных при цитометрии событий — 75 453, из них лимфоцитов (CD45++ SSCLOW) — 1216 (1,61%)

Субпопуляции лимфоцитов ткани рака молочной железы (кор-биопсийный материал)

Описательные статистики

Субпопуляция (CD)	Количество больных	Процент клеток			
		Минимум	Максимум	Среднее	Стд. ошибка
CD3	18	72,90	95,00	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	,43	1,43	,9565	,07670
CD4+CD25+	14	,58	9,13	4,0943	,77425
CD3+CD56+	17	,59	28,00	4,4676	1,56628
CD3-CD56+	17	,00	4,12	1,5929	,34319
Процент CD45++SSCLOW	19	,10	9,54	2,1121	,67986

количество которых достигало 95% от числа лимфоцитов, в среднем $88,2 \pm 1,6\%$. Количество CD4-лимфоцитов незначительно преобладало над количеством цитотоксических лимфоцитов (CD8+) — в среднем 45,1% и 40,4% соответственно. Соотношение CD8:CD4 в целом по группе составило 0,96. Уровень клеток естественных киллеров (CD45+CD3-CD56+) был, как правило, незначительным и не превышал 4,12%. Т-регуляторные клетки находились в диапазоне от 0,58 до 9,13%, в среднем — $4,1 \pm 0,8\%$.

Полученные данные подтверждают результаты предшествующих исследований относительно главенствующей роли Т-лимфоцитарного звена иммунитета в инфильтрации опухолевой ткани рака молочной железы [1–4]. Вместе с тем впервые количественно подтверждено, что среди тумор-инфильтрирующих лимфоцитов преобладают CD4-клетки (44,1%) над цитотоксическими CD8+ лимфоцитами (40,4%), и соотношение CD8/CD4 не достигает единицы (0,96). Учитывая, что преобладание CD4 клеток — фактор неблагоприятного прогноза [5, 6], нам кажется целесообразным приступить к разработке возможных методик, направленных на повышение уровней CD8 лимфоцитов и соотношения CD8/CD4 в опухолевой ткани больных раком молочной железы.

Учитывая особенности субпопуляционного состава лимфоцитов в ткани рака молочной железы, становится очевидным, что этот вопрос необходимо рассматривать индивидуально. Действительно, у девяти из 15 пациенток, у которых было изучено соотношение CD8/CD4 в опухолевой ткани, значение индекса было менее 1 (минимально 0,4),

однако в восьми случаях Т-цитотоксические лимфоциты преобладали — от 1,14 до 1,4.

Содержание TNK-клеток и естественных киллеров было, как правило, невысоким. На рисунке 2 представлены эти субпопуляции интратуморальных лимфоцитов.

Важное значение в исследованиях противоопухолевого иммунитета придается анализу Т-регуляторных клеток — субпопуляции CD4+CD25++ лимфоцитов, способных подавлять иммунный ответ

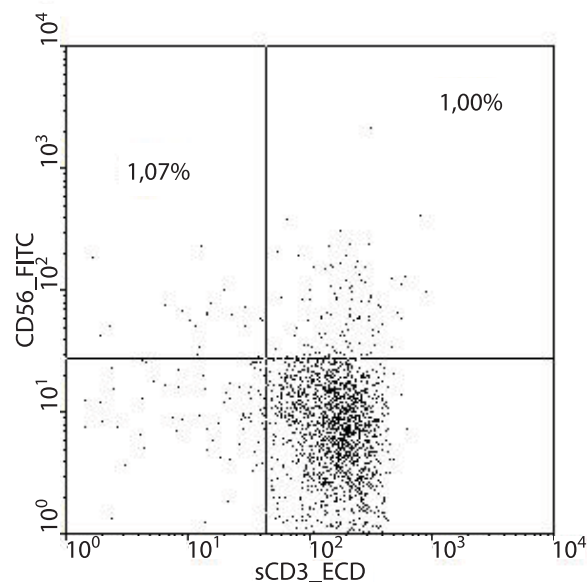


Рис. 2. Субпопуляции TNK-клеток и естественных киллеров в ткани рака молочной железы (материал кор-биопсии). Анализ в гейте CD45++/SSCLOW лимфоцитов (выделение гейта показано на рис.1). Четко видны субпопуляция TNK-клеток (CD56+CD3+) — 1,0% и субпопуляция естественных киллеров (CD56+CD3-) — 1,07%

на опухолевые антигены. Пример выраженной пропорции CD4+CD25+ интралимфоцитарных лимфоцитов в материале кор-биопсии рака молочной железы представлен на рисунке 3.

Как видно на рисунке 3, 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).

Наибольший интерес представляют случаи рака молочной железы, которые на основании субпопуляционного состава интралимфоцитарных лимфоцитов могут быть расценены как прогностически неблагоприятные, с минимальной инфильтрацией опухоли лимфоцитами и низким содержанием Т-цитотоксических (CD8+) клеток.

Известно, что 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 интралимфоцитарных лимфоцитов. Для минимизации количества необходимого

для исследования материала следует использовать многопараметровую (четырёхцветную) 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.

Уровни инфильтрации рака молочной железы лимфоцитами нами были разделены на низкие (менее 0,5% лимфоцитов от общего числа событий) — семь из 19 больных (36,8%), умеренные (0,5 — 2%) — 8/19 (42,1%) и высокие (более 2%) — 4/19 (21,1%). В основном преобладают случаи с низкой и умеренной лимфоидной инфильтрацией (79%).

До 95% интралимфоцитарных лимфоцитов рака молочной железы составляют зрелые Т-клетки (CD3+). Их субпопуляционный состав характеризуется преобладанием в Т-хелперов (CD4+) над Т-цитотоксическими лимфоцитами (CD8+), соотношение CD8/CD4 менее 1 — 53% случаев, более 1 — 47% случаев.

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

Из проанализированных субпопуляций интралимфоцитарных лимфоцитов только Т-цитотоксические (CD8+) 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%, $p=0,007$. Это позволяет предположить, что именно CD8+ лимфоциты во многом определяют общий уровень лимфоидной инфильтрации рака молочной железы. Подобное заключение о существовании положительной взаимосвязи между общим уровнем лимфоидной инфильтрации рака молочной железы и уровнем инфильтрации Т-цитотоксическими (CD8+) 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++ SSSC^{Low}) с процентом TNK-клеток были иными: более высокое содержание TNK-клеток

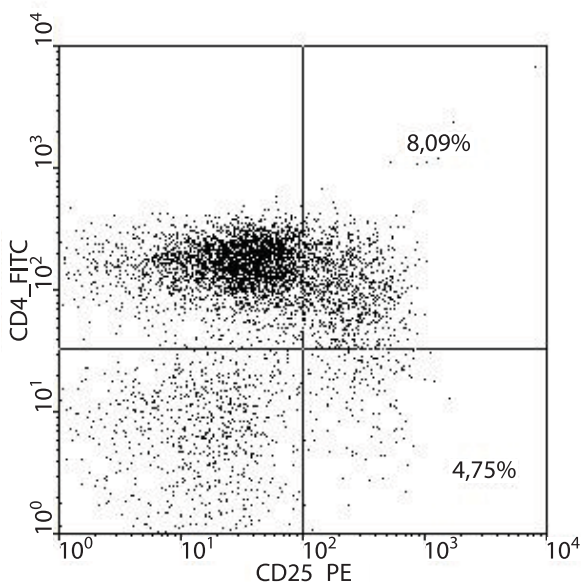


Рис. 3. Экспрессия CD25 на CD4+ Т-лимфоцитах и на CD4-негативных Т-клетках. Анализ в гейте CD45++/SSC^{Low} CD3-позитивных лимфоцитов. Количество CD3+CD4+CD25+ лимфоцитов — 8,09%.

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	Стд. Ошибка среднего	P
CD3	,00*	7	86,8729	6,63905	0,57
	1,00	11	88,8118	7,01793	
CD8	,00	6	32,9833	2,68878	0,007
	1,00	11	44,3855	8,51905	
CD4	,00	7	43,8943	12,71022	0,7
	1,00	11	45,8782	8,55217	
CD8/CD4	,00	6	,8500	,33009	0,32
	1,00	11	1,0145	,30826	
CD4+CD25+	,00	5	5,2640	2,93215	0,28
	1,00	9	3,4444	2,82996	
CD3+CD56+	,00	6	8,6467	9,93105	0,045
	1,00	11	2,1882	1,10516	
CD3-CD56+	,00	6	1,7150	1,70007	0,81
	1,00	11	1,5264	1,32085	

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

отмечено при низкой лимфоидной инфильтрации опухоли.

Представленные результаты свидетельствуют о возможности количественного исследования субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов рака молочной железы на материале кор-биопсии. Эти данные могут быть использованы

для разработки критериев 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 гемопозеза. 2009. Т. 6, № 1. С. 8-51
2. Артамонова Е.В., Огнерубов Н.А., Тупицын Н.Н., Летагин В.П. Рак молочной железы: иммунологические факторы прогноза. Воронеж: ВГУ, 2005. 240 с.
3. Субботина А.А., Летагин В.П., Тупицын Н.Н., Ермилова В.Д., Высоцкая И.В. Роль иммунофенотипирования рака молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии. // Иммунология гемопозеза. 2009. Т. 6, № 1. С. 52–78
4. Тупицын Н.Н. Иммунофенотип рака молочной железы. В кн. Рак молочной железы/Под ред. Н.Е.Кушлинского, С.М.Портного, К.П.Лактионова. М.:Издательство РАМН. 2005. С. 174–197.
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. V. 1, № 1. P. 54–67.
6. Ruffel B., Au A., Rugo H.S. et al. Leucocyte composition in human breast cancer. PNAS. 2012. V. 109, № 8. P. 2796–2801.