

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНОЙ ФОРМЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.И. Беришвили, Н.Н. Тупицын, К.П. Лактионов

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF INFLAMMATORY BREAST CANCER

A.I. Berishvili, N.N. Tupitsyn, K.P. Laktionov

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

The investigation enrolled 31 patients with inflammatory breast cancer (IBC) treated at the N. N. Blokhin Cancer Research Center from 2006 to 2008. IBC is diagnosed on the basis of signs of rapid progression, such as localized or generalized breast induration, redness and edema. IBC accounts for less than 5% of all diagnosed breast cancers and is the most lethal form of primary breast cancer. We studied tumor markers of the immunophenotype of IBC and levels and subpopulations of immunocompetent tumor-infiltrating cells. We found that expression of HLA-DR is in negative correlation with MUC-1 expression and lymphoid cells tumor infiltration is associated with the increase in T-cell subpopulations.

Key words: breast cancer, inflammatory breast cancer, immunophenotyping

Отечно-инфильтративная форма (ОИФ) рака молочной железы (РМЖ) является частью местно-распространенного (МР) РМЖ и составляет 1–6% всех случаев РМЖ в США [1–3]. ОИФ РМЖ характеризуется тремя биологическими особенностями: быстрым ростом опухоли, высокой ангиоинвазивностью и ангиогенностью и, наконец, высоким метастатическим потенциалом. Несмотря на мультимодальное лечение, прогноз данного заболевания остается неблагоприятным, а 3-летняя выживаемость не превышает 30–40%, тогда как при МР РМЖ она достигает 85% [2, 4].

В настоящее время выделяют ряд опухолевых маркеров, коррелирующих с основными биологическими и прогностическими характеристиками опухоли:

- HLA I — главный комплекс гистосовместимости, ответственный за связывание белков, синтезируемых в клетке или поступающих извне, и их транспорт на мембрану клетки для распознавания Т-киллерами или Т-хелперами [5]; в 50% случаев утрачивается при РМЖ [6];
- HLA-DR — играет важную роль в иммунном ответе, являясь рецептором для антигенных пептидов, распознающихся Т-хелперными (CD4) лимфоцитами;
- MUC-1 — один из наиболее значимых опухолевых маркеров РМЖ, являющийся комплексом гликопротеинов на клеточной поверхности со способностью отделяться от нее и циркулировать в крови, сигнализируя о существовании опухоли, а при последовательном его определении — и о рецидивировании, прогрессировании или ответе на лечение [7];

вировании, прогрессировании или ответе на лечение [7];

- панцитокератин (набор цитокератинов, выявляемых антителами KL-1) — определяется в 100% случаев РМЖ и является важным маркером микрометастазирования и циркулирующих опухолевых клеток;
- ЕрСАМ (HEA-125) — панэпителиальный антиген, представленный на клетках первичного и метастатического РМЖ; может быть полезен в оценке степени распространенности РМЖ [8];
- рецептор трансферрина (CD71) — мембранный гликопротеин, обеспечивающий транспорт железа через клеточную мембрану; является косвенным критерием пролиферации опухолевых клеток, имеющих повышенное число трансферриновых рецепторов и дающих им ростовые преимущества.

Ключевая роль в осуществлении противоопухолевого иммунитета принадлежит цитотоксическим Т-лимфоцитам, активированным различными опухолеассоциированными антигенами [9]. Наряду с общей инфильтрацией опухолевой ткани важное значение имеет количественный и качественный состав опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, главным образом CD8⁺-Т-киллеров, являющихся эффекторами противоопухолевого иммунитета [10].

Цель исследования — выявление иммунофенотипических особенностей ОИФ РМЖ, имеющих прямую связь с опухолевой прогрессией и противоопухолевым иммунитетом, а также уровней и субпопуляций иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих РМЖ.

Материалы и методы

В исследование вошла 31 пациентка с ОИФ РМЖ, получавшая лечение в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в период с 2006 по 2008 г. Исследование проведено с использованием панели моноклональных антител (МКА).

Срезы опухолей молочных желез фиксировали в ацетоне, после этого отмывали в среде 199 в течение 10 мин. Затем наносили меченные флуоресцеинизотиоцианатом антисыворотки или МКА и инкубировали на протяжении 30 мин, после чего снова отмывали в среде 199 10 мин. Клетки консервировали 50% глицерином на физиологическом растворе и учитывали специфическое свечение на люминисцентном микроскопе.

При иммунофенотипировании выделяли 3 типа взаимодействия антител с опухолевыми клетками:

- 1) *отрицательная реакция (-)* — < 10% антигенположительных опухолевых клеток;
- 2) *мозаичная реакция (±)* — антиген присутствовал на части (от 10 до 80%) опухолевых клеток;
- 3) *мономорфная реакция (+)* — антиген экспрессируется большинством (> 80%) опухолевых клеток.

Также при иммунофенотипировании иммунокомпетентных клеток в гистологических срезах опухоли выделяли 3 типа иммунных реакций:

- 1) *отрицательная* — антигенположительные клетки не определяются или определяется небольшое их число в препарате;
- 2) *умеренная* — умеренное количество антигенположительных клеток, расположенных разрозненно или мелкими группами;
- 3) *выраженная* — множество антигенположительных клеток в срезе, могут встречаться крупные группы и инфильтраты из этих клеток.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы SPSS: корреляционный анализ, сравнение средних величин, анализ по таблицам сопряженности признаков с применением критерия χ^2 .

Результаты

Исследование иммунофенотипа опухолевых клеток при ОИФ РМЖ проведено у 31 пациентки. Частота экспрессии различных маркеров опухолевых клеток представлена в таблице.

В 100% случаев опухолевые клетки экспрессировали панцитокератины и общеэпителиальный антиген ЕрСАН-1 (МКА HEA-125), в большинстве (96,8%) — MUC-1. С различной частотой отмечалась экспрессия молекул гистосовместимости I и II классов, а также трансферрино-

го рецептора CD71. Среди интратуморальных лимфоцитов преобладали Т-киллеры (CD45⁺, CD7⁺, CD8⁺), а инфильтрация опухоли макрофагами, В-лимфоцитами и НК-клетками была незначительной.

Проведен анализ взаимосвязи экспрессии различных иммунологических маркеров опухолевых клеток. Следует отметить, что наиболее хорошо известные и неоднократно подтвержденные закономерности в экспрессии иммунологических маркеров при ОИФ РМЖ не наблюдались. Так, экспрессия молекул гистосовместимости I и II классов не была взаимозависимой, хотя многократные исследования, проведенные на большом количестве материала, подтвердили, что экспрессия HLA-DR имеет место только при наличии молекул HLA I. При ОИФ РМЖ экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости I класса (мономорфная и мозаичная) характеризовалась высокой частотой — 67,7%. Вместе с тем в 20% случаев при полном отсутствии молекул HLA I на опухолевых клетках выявлялись молекулы HLA-DR ($p=0,48$).

Молекулы MUC-1 встречаются почти в 100% случаев РМЖ [6]. В нашей выборке частота экспрессии MUC-1 при ОИФ РМЖ составила 96,8%. В 16,1% случаев антиген обнаруживался лишь на части клеток. Интересен тот факт, что именно при полном или частичном отсутствии на клетках молекулы MUC-1 наблюдалась максимальная частота мономорфной экспрессии HLA-DR. Так, при мономорфном характере экспрессии MUC-1 данный тип реакции HLA-DR отмечен в 4% случаев, при мозаичном — в 40%, отрицательном — в 100% ($p=0,011$). Напомним, что в целом по группе мономорфный тип экспрессии HLA-DR зафиксирован всего лишь у 4 (12,9%) из 31 больной.

Таким образом, особенности экспрессии иммунологических маркеров на клетках РМЖ ОИФ касаются в основном молекул HLA-DR. Эти молекулы могут появляться при отсутствии HLA I класса и находятся в обратной корреляционной связи с экспрессией MUC-1, т.е. максимальная частота мономорфной экспрессии HLA-DR наблюдается при отсутствии MUC-1.

На следующем этапе проводилась оценка того, насколько уровни ОИФ РМЖ с различными субпопуляциями лимфоцитов и макрофагами зависят от иммунофенотипических особенностей опухолевых клеток — экспрессии HLA I и II классов, MUC-1 и трансферринового рецептора CD71.

Уровни инфильтрации опухоли иммунокомпетентными клетками не зависели от фенотипа РМЖ. Единственным исключением явился

Частота экспрессии маркеров опухолевых клеток у больных ОИФ РМЖ

Показатель	Экспрессия	Число больных	Число случаев с данным типом экспрессии	Частота реакции, %
Опухолевый маркер:				
HLA I	Мономорфная	31	13	41,9
	Мозаичная	31	8	25,8
	Отрицательная	31	10	32,3
HLA-DR	Мономорфная	31	4	12,9
	Мозаичная	31	6	19,4
	Отрицательная	31	21	67,7
MUC-1	Мономорфная	31	25	80,6
	Мозаичная	31	5	16,1
	Отрицательная	31	1	3,2
панцитокератины (KL-1)	Мономорфная	23	23	100
ЕрСАМ (HEA-125)	Мономорфная	24	24	100
рецептор трансферрина (CD71)	Мономорфная	31	20	64,5
	Мозаичная	31	8	25,8
	Отрицательная	31	3	9,7
Уровень инфильтрации макрофагами и субпопуляциями интратуморальных лимфоцитов:				
макрофаги (CD163, D11)	Выраженная	22	3	13,7
	Умеренная	22	7	31,8
	Слабая	22	12	54,5
Все лейкоциты (CD45)	Выраженная	31	13	41,9
	Умеренная	31	8	25,8
	Слабая	31	10	32,3
Т-клетки (CD7)	Выраженная	31	6	19,5
	Умеренная	31	11	35,5
	Слабая	31	14	45,2
Т-хелперы (CD4)	Умеренная	23	7	30,4
	Слабая	23	16	69,6
Т-киллеры (CD8)	Выраженная	23	2	8,7
	Умеренная	23	5	21,7
	Слабая	23	16	69,6
NK-клетки (CD16)	Умеренная	23	2	8,7
	Слабая	23	21	91,3
В-клетки (CD20)	Умеренная	7	10	70
	Слабая	3	10	30

антиген MUC-1. Инфильтрация опухоли CD16⁺-лимфоцитами находилась в обратной зависимости от экспрессии этого антигена. Максимальные уровни инфильтрации зафиксированы при отсутствии экспрессии MUC-1 или при мозаичной его экспрессии ($p=0,04$). Следует отметить, что в целом NK-клеточная (CD16) инфильтрация опухоли была слабой, и для окончательных выводов необходимо дальнейшее накопление материала.

Наиболее интересные данные получены при анализе взаимосвязи между различными субпопуляциями лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевую ткань ОИФ РМЖ. Общий уровень лейко-

цитарной инфильтрации (CD45) коррелировал со степенью инфильтрации опухоли CD7⁺ Т-клетками ($p=0,014$), CD8⁺ Т-киллерами ($p=0,0001$), CD4⁺ Т-хелперами ($p=0,0001$), CD20⁺ В-клетками и CD16⁺ NK-клетками ($p=0,052$). Связи с макрофагальной инфильтрацией нами не установлено ($p=0,26$).

При анализе сопряженности признаков связь между общелейкоцитарной (CD45) и Т-клеточной (CD7) инфильтрацией была довольно сильной ($p=0,002$). Слабая Т-клеточная инфильтрация наблюдалась в 57% случаев на фоне слабо выраженной лейкоцитарной инфильтрации, в 43% — на фоне умеренной и никогда (0%) — на фоне выра-

женной инфильтрации. Напротив, выраженная лимфоцитарная инфильтрация (CD45) доминировала (83%) при наличии значительной Т-клеточной реакции.

Аналогичные закономерности отмечены в отношении Т-киллерных клеток. Выявленная инфильтрация опухоли этими клетками имела место только при наличии сильной общелейкоцитарной инфильтрации. Напротив, при отсутствии последней значительной Т-клеточной инфильтрации не наблюдали ($p=0,001$).

Общая лейкоцитарная инфильтрация коррелировала с уровнями интратуморальных Т-хелперных клеток ($p=0,002$), а взаимосвязь с В-лимфоцитами ($p=0,08$) и NK-клетками ($p=0,08$) была близка к достоверной.

Таким образом, выраженность общей инфильтрации опухолевой ткани лимфоидными клетками сопровождается достоверным нарастанием уровней инфильтрации субпопуляциями Т-клеток, включая Т-хелперы и Т-киллеры. Взаимосвязей с В-лимфоцитами, CD16⁺-клетками и макрофагами не установлено.

Из числа изученных популяций лимфоцитов наиболее выраженные уровни инфильтрации были характерны для Т-клеток (CD7⁺), причем Т-клеточная инфильтрация отражалась как на числе интратуморальных Т-киллеров, так и Т-хелперов. Значительно более тесная связь отмечена с Т-киллерами ($p=0,001$), нежели с Т-хелперами ($p=0,033$). Общий уровень Т-клеток был взаимосвязан с макрофагальной инфильтрацией ($p=0,036$).

Субпопуляции интратуморальных Т-хелперов и Т-киллеров были взаимосвязаны ($p=0,01$). В свою очередь, уровни Т-киллеров коррелировали с макрофагами ($p=0,036$), а уровни Т-хелперов — с CD16-клетками ($p=0,03$).

Обсуждение

Имунофенотипические особенности РМЖ ОИФ изучены нами у 31 больной. Объектом исследования явилась ткань опухоли, удаленной во время операции. Субпопуляции интратуморальных лимфоцитов и макрофагов, а также антигенную структуру опухолевых клеток изучали на свежемороженых (криостатных) срезах.

Полученные нами данные, с одной стороны, подтверждают некоторые общие закономерности в иммунофенотипической структуре РМЖ, а с другой — позволяют предполагать существование некоторых уникальных особенностей, присущих именно данной форме рака.

Если судить по частоте экспрессии тех или иных маркеров опухолевых клеток, то ОИФ РМЖ не отличается существенно от основной группы РМЖ. То же касается и уровней инфильтрации

опухоли макрофагами и субпопуляциями лимфоцитов. Однако при более внимательном рассмотрении становится очевидным, что многие закономерности в экспрессии антигенов опухолевыми клетками и взаимосвязи с субпопуляциями интратуморальных лимфоцитов, присущие другим формам РМЖ, при ОИФ РМЖ не наблюдаются.

Общность ОИФ РМЖ с другими формами РМЖ касается, в первую очередь, взаимосвязей между субпопуляциями опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Выраженность общелейкоцитарной инфильтрации отражается практически на всех субпопуляциях интратуморальных лимфоцитов — CD7, CD4, CD8. Это вполне объяснимо, так как инфильтрация по CD45 является, по существу, суммой каждой из этих популяций. Недостовверная связь с CD20 и CD16, вероятно, объясняется крайней малочисленностью этих типов клеток в опухолевых срезах и их незначительным вкладом в выраженность общей лимфоидной инфильтрации.

Особенности иммунофенотипа ОИФ РМЖ в первую очередь касаются экспрессии молекул HLA-DR, обратной взаимозависимости в экспрессии этих молекул с MUC-1 и нарастания уровней NK-клеточной инфильтрации (CD16) в случаях утраты MUC-1 на всех опухолевых клетках или их части. К иммунологическим особенностям ОИФ РМЖ можно, по-видимому, отнести и отсутствие взаимосвязи между общелейкоцитарной и макрофагальной инфильтрацией.

Дискордантность экспрессии HLA-DR-антигенов с молекулами HLA I класса свидетельствует о существовании HLA-DR⁺ РМЖ, в части случаев которого на мембране отсутствуют молекулы гистосовместимости I класса. Кроме того, по данным X. Lin и соавт. [11], частота случаев обнаружения HLA-DR нарастает при снижении экспрессии MUC-1, что подтверждается и результатами проведенного исследования. Возможно, именно детальный анализ экспрессии молекул HLA-DR и взаимосвязи их с воспалительной реакцией позволит дать ключ к пониманию некоторых патогенетических моментов формирования этой особой формы РМЖ.

При РМЖ отмечается значительная вариабельность экспрессии молекул HLA II, причем лишь в небольшом числе случаев (7—12%) присутствует выраженная пропорция положительных клеток (40—95%). В большинстве случаев (61%) наблюдается утрата экспрессии HLA II на клетках РМЖ, причем в 10—28% — полная. Экспрессия молекул HLA I и II в метастазах в целом напоминает таковую в первичных опухолях, однако имеют место случаи дискордантной экспрессии (HLA I — 32%, HLA-DR — 18%) [11].

Экспрессия антигенов HLA II класса может иметь определенную взаимосвязь со степенью гистологической дифференцировки РМЖ ($p < 0,05$). При высокодифференцированных карциномах не наблюдается полной потери экспрессии HLA II. Антигены HLA-DR сильно экспрессированы на внутрисосудистых опухолевых тромбах, в особенности при ОИФ РМЖ [12]. При исследовании 94 случаев РМЖ установлено, что экспрессия молекул HLA II класса имеет место при более дифференцированных и прогностически более благоприятных опухолях. Экспрессия HLA-DR коррелирует не только со степенью дифференцировки опухоли, но и с экспрессией рецепторов прогестерона — двумя параметрами благоприятного прогноза [13]. Последние публикации свидетельствуют о том, что мембранные молекулы HLA II являются одним из главных факторов, ассоциированных с метастазированием при РМЖ [14]. Вместе с тем не выявлено прямой связи экспрессии Ii/HLA-D-антигенов со степенью злокачественности опухоли, что позволяет рассматривать данный признак как самостоятельный параметр. Отсутствие корреляции появления экспрессии молекул HLA-DR на клетках РМЖ с прогностическими параметрами подтверждено К. Lucin и соавт. [15] при иммуногистохимиче-

ском изучении 75 случаев инвазивного протокового РМЖ, 25 из которых были HLA-DR-положительными. Убедительные данные о влиянии экспрессии молекул гистосовместимости на прогноз РМЖ получены Е.В. Артамоновой и соавт. [16]. Авторы доказали, что влияние HLA-фенотипа на прогноз РМЖ реализуется опосредованно, через действие иммунной системы в иммунокомпетентном организме. В условиях повреждения иммунной системы (что очень часто происходит в процессе неoadъювантной и адъювантной химио- или химиолучевой терапии РМЖ) судить о прогностической роли молекул HLA I и II чрезвычайно сложно.

Заключение

Особенности экспрессии иммунологических маркеров на клетках ОИФ РМЖ касаются в основном молекул HLA-DR. Эти молекулы могут появляться при отсутствии HLA I класса и находятся в обратной корреляционной связи с экспрессией MUC-1, т.е. максимальная частота мономорфной экспрессии HLA-DR наблюдается при отсутствии MUC-1, а выраженность общей инфильтрации опухолевой ткани лимфоидными клетками сопровождается достоверным нарастанием уровней инфильтрации субпопуляциями Т-клеток, включая Т-хелперы и Т-киллеры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kleer C., van Golen K., Merajver S. Molecular biology of breast cancer metastasis: inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Res* 2000;2(Suppl 6):423—9.
2. Chang S., Parker S.L., Pham T. et al. Inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program of the National Cancer Institute, 1975—1992. *Cancer* 1998;82:2366—72.
3. Hance K.W., Anderson W.F., Devesa S.S. et al. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:966—75.
4. Cristofanilli M., Buzdar U., Hortobagyi G.N. Update on the management of inflammatory breast cancer. *The Oncologist* 2003;8(2):141—8.
5. Nouri A.M., Torabi-Puor N., Oliver R.T. Isolation of human leucocyte antigen (HLA)-associated peptide(s) in absence of HLA-restricted specific cytolytic T lymphocytes (CTL). *Eur J Cancer* 2001;37(Suppl 6):110.
6. Тупицын Н.Н., Кадагидзе З.Г., Блохина Н.Г. и др. Экспрессия лейкоцитарных и родственных им антигенов на клетках рака молочной железы человека. *Экспер онкол* 1990;12(2):54—8.
7. Petrakou E., Murray A., Price M. Epitope mapping of antiMUC-1 Mucin protein core monoclonal antibodies. *Tumor Biol* 1998;19(Suppl 1):21—9.
8. Летягин В.П., Паниченко А.В., Крохина О.В. Иммуноморфологическое стадирование рака молочной железы. *Вестн РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2001;(3):44—7.
9. Kawashima I., Hudson S. J., Tsai V. et al. The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors. *Hum Immunol* 1998;59(1):1—14.
10. Nicolini A., Carpi A. Immune manipulation of advanced breast cancer: an interpretative model of the relationship between immune system and tumor cell biology. *Med Res Rev* 2009;29(Suppl 3):436—71.
11. Lin X., Wang X., Capek H.L. et al. Effect of invariant chain on major histocompatibility complex class I molecule expression and stability on human breast tumor cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58(Suppl 5):729—36.
12. Conha A., Ruiz-Cabello F., Cabrera T. et al. Different patterns of HLA-DR antigen expression in normal epithelium, hyperplastic and neoplastic malignant lesions of the breast. *Eur J Immunogenet* 1995;22(4):299—310.
13. Тупицын Н.Н. Иммунофенотип рака молочной железы. В кн.: *Рак молочной железы*. Под ред. Н.Е. Кушлинского, С.М. Портного, К.П. Лактионова. М.: РАМН, 2005. с. 174—97.
14. Schuetz F., Ehler K., Schneeweiss A. et al. Treatment of advanced breast cancer with bone marrow-derived tumour-reactive memory T-cells: a pilot clinical study. *Cancer Immunol Immunother* 2009;59(Suppl 6):887—900.
15. Lucin K., Iternicka Z., Jonjic N. Prognostic significance of T-cell infiltrates, expression of beta 2-microglobulin and HLA-DR antigens in breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 1994;190(12):1134—40.
16. Артамонова Е.В., Огнерубов Н.А., Тупицын Н.Н., Летягин В.П. Рак молочной железы: иммунологические факторы прогноза. Воронеж: Воронеж. Гос. ун-т, 2005.