

Для цитирования: Бузенкова А.В., Таширева Л.А., Завьялова М.В., Перельмутер В.М. Особенности клеточного состава опухолевой ниши инвазивной протоковой карциномы неспецифического типа молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2022; 21(5): 59–68. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-5-59-68

For citation: Buzenkova A.V., Tashireva L.A., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M. The features of tumor niche cell composition in invasive breast ductal carcinoma of no special type. Siberian Journal of Oncology. 2022; 21(5): 59–68. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-5-59-68

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ОПУХОЛЕВОЙ НИШИ ИНВАЗИВНОЙ ПРОТОВОКОЙ КАРЦИНОМЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.В. Бузенкова¹, Л.А. Таширева¹, М.В. Завьялова^{1,2}, В.М. Перельмутер¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5. E-mail: buzenkova_av@mail.ru¹

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия²

Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2²

Аннотация

Рак молочной железы занимает ведущую позицию в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований у женщин репродуктивного возраста. Прогрессия опухоли зависит от характера стромально-паренхиматозных отношений. Микроокружение опухоли во многом определяет вариант и степень выраженности прогрессии. Существенным элементом микроокружения является «опухолевая ниша», которая, по существующим представлениям, включает, кроме клеточных элементов иммунной системы, костномозговые клетки-предшественники. В нашем исследовании охарактеризованы параметры опухолевой ниши инвазивной протоковой карциномы молочной железы неспецифического типа (ИПКНТ), ассоциированные с лимфогенным метастазированием. **Цель исследования** – изучение особенностей клеточного состава опухолевой ниши ИПКНТ. **Материал и методы.** В исследование включено 128 больных с диагнозом ИПКНТ Т1–3N0–3M0 стадии, в возрасте от 29 до 90 лет, прооперированных в объеме радикальной мастэктомии или секторальной резекции молочной железы с аксиллярной лимфодиссекцией. Морфологическое исследование операционного материала выполнялось по стандартным методикам. Для выявления костномозговых клеток-предшественников готовили суспензии из образцов свежезамороженного операционного опухолевого материала. Применяли антитела против CD34, CD133, CD90, CD11b, CD45, CD202. **Результаты.** Наличие совокупности гемопозитических клеток-предшественников и клеток-предшественников макрофагов в количестве, превышающем 1,24 клетки на 100 опухолевых клеток, ассоциировано с риском развития лимфогенных метастазов и большим размером опухоли. **Заключение.** Результаты проведенного исследования могут быть полезны для понимания сущности опухолевой ниши и ее роли в росте опухоли и лимфогенной прогрессии ИПКНТ.

Ключевые слова: рак молочной железы, опухолевая ниша, премеаастатическая ниша, клетки-предшественники, лимфогенное метастазирование.

THE FEATURES OF TUMOR NICHE CELL COMPOSITION IN INVASIVE BREAST DUCTAL CARCINOMA OF NO SPECIAL TYPE

А.В. Buzenkova¹, Л.А. Tashireva¹, М.В. Zavyalova^{1,2}, В.М. Perelmuter¹

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

5, Kooperativny St., 634009, Tomsk, Russia. E-mail: buzenkova_av@mail.ru¹

Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Tomsk, Russia²

2, Moskovsky tract, 634050, Tomsk, Russia²

Abstract

Breast cancer is the most common cancer and the leading cause of cancer death in woman of childbearing age. Tumor progression depends on the character of stromal-parenchymal interactions. Tumor microenvironment exerts a key influence on tumor progression. Tumor niche is an important element of the tumor microenvironment. According to existing ideas, tumor niche consists on immune cells and bone marrow progenitor cells. The present study describes the parameters of tumor niche in invasive breast carcinoma of no special type (IC-NST), associated with lymph node metastases. **The purpose of the study** was to investigate the features of tumor niche cell composition in IC-NST. **Material and Methods.** The study included 128 patients with IC-NST (T1–3N0–3M0), who underwent total mastectomy or partial mastectomy with axillary lymph node dissection. The age of the patients ranged from 29 to 90. Histological examination of surgical specimens was carried out in accordance with standard methods. Suspensions of fresh frozen tumor surgical specimens were prepared for the hematopoietic progenitor cells identification. The antibodies against CD34, CD133, CD90, CD11b, CD45, and CD202 were applied. **Results.** The study showed that the total number of hematopoietic stem and progenitor cells and macrophage progenitor cells in an amount exceeding 1.24 cells per 100 tumor cells was associated with the risk of developing lymph node metastases and large tumor size. **Conclusion.** The results obtained may be useful for understanding the role of tumor niche in tumor growth and lymph node metastasis of IC-NST.

Key words: breast cancer, tumor niche, premetastatic niche, progenitor cells, lymph node metastasis.

Введение

Инвазивная протоковая карцинома неспецифического типа молочной железы (ПМЖ) является самой распространенной формой злокачественных новообразований у женщин репродуктивного возраста [1, 2]. В настоящее время метастатический потенциал опухоли связывают не только с ее паренхиматозным компонентом, но и с особенностями строения и функционирования опухолевой стромы, которая формирует микроокружение, способствующее прогрессии опухоли [3]. В микроокружении опухоли выделяют так называемые опухолевые ниши, которые представлены рекрутируемыми под влиянием опухолевых хемокинов костномозговыми клетками-предшественниками, в частности, гемопоэтическими клетками-предшественниками (HSPCs), эндотелиальными клетками-предшественниками (EPCs), предшественниками макрофагов (MPs) и мезенхимальными стволовыми клетками (MSCs), а также компонентами внеклеточного матрикса, сосудистой сетью, фибробластами и различными иммунными клетками [4]. Компоненты опухолевой ниши обладают разными функциями, однако общий вектор в конечном итоге направлен на прогрессию опухоли. Так, MSCs являются предшественниками фибробластов, формирующих строму опухоли [5]. Опухоль-ассоциированные фибробласты являются компонентом микроокружения, синтезируют и ремоделируют коллагеновые волокна и синтезируют белки межклеточного матрикса, включая фибронектин. Богатые фибронектином, ремоделированные участки ткани являются привлекательными для HSPCs, рекрутированных из костного мозга (КМ) [6]. Входя в состав опухолевых ниш, данная клеточная популяция синтезирует спектр цитокинов, способствующих повышенной проницаемости сосудов, усиленной пролиферации

опухолевых клеток и мобилизации других клеток-предшественников из КМ [7]. EPCs способствуют процессам неоваскуляризации опухоли [8, 9]. Поскольку опухолевая ниша, как правило, формируется на фоне персистирующего воспаления, присутствие в ней MPs – закономерно. MPs дают начало опухоли-ассоциированным макрофагам (TAMs). TAMs секретируют эпидермальный фактор роста (EGF), который, в свою очередь, способствует поддержанию пролиферации опухолевых клеток [10]. Исходя из этих знаний, можно предположить, что HSPCs, MSCs, EPCs и MPs могут быть связаны, как минимум, с двумя показателями, характеризующими злокачественный потенциал опухоли, – ее ростом и способностью к метастазированию. Кроме того, опухолевые ниши, по сути, являются прототипом преметастатических ниш, идентификация которых в настоящее время недоступна для исследователя.

Цель исследования – изучение особенностей клеточного состава опухолевой ниши ИПКНТ (HSPCs, MSCs, EPCs и MPs) с клиническими проявлениями опухолевого процесса.

Материал и методы

В исследование включено 128 больных инвазивной протоковой карциномой неспецифического типа молочной железы (ИПКНТ) T1–3N0–3M0 стадии, в возрасте от 29 до 90 лет (средний возраст – $53,11 \pm 10,2$ года), получавших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2014 по 2020 г. Диагноз установлен на основании клинических, морфологических и иммуногистохимических критериев (табл. 1). Все пациентки подверглись хирургическому вмешательству в объеме радикальной мастэктомии или секторальной резекции молочной железы с аксиллярной лимфодиссекцией. Исследование проводилось при

Таблица 1/ Table 1

Характеристика больных инвазивной протоковой карциномой неспецифического типа молочной железы

Characteristics of patients with invasive ductal breast carcinoma of no special type

Параметр/Parameter		Частота встречаемости/ Frequency rate
Возраст пациента/ Patients' age	53,11 ± 10,2 года/years	
Молекулярно-генетический подтип/ Molecular subtype	Люминальный A/ Luminal A	37,5 % (48/128)
	Люминальный B/ Luminal B	62,5 % (80/128)
Стадия/ Stage	I	21,9 % (28/128)
	IIA	42,2 % (54/128)
	IIIB	16,4 % (21/128)
	IIIA-C	8,6 % (11/128)
Лимфогенные метастазы/ Lymph node metastasis	Присутствуют/Yes	30,5 % (39/128)
	Отсутствуют/No	51,5 % (66/128)
Гематогенные метастазы/ Hematogenous metastasis	Присутствуют/Yes	0,5 % (7/128)
	Отсутствуют/No	90,6 % (116/128)
Экспрессия ER/ER expression	Присутствуют/Yes	100 % (128/128)
	Отсутствуют/No	0 % (0/128)
Экспрессия PR/PR expression	Присутствуют/Yes	91,4 % (117/128)
	Отсутствуют/No	8,6 % (11/128)
Экспрессия HER2/ HER2 expression	Присутствуют/Yes	5,5 % (7/128)
	Отсутствуют/No	94,5 % (121/128)
Ki67/ Ki67	< 20 %	23,4 % (30/128)
	>20 %	76,6 % (98/128)
Размер опухоли/Tumor size	До 2 см/< 2 cm	25,8 % (33/128)
	2–5 см/2–5 cm	64,8 % (83/128)
Состояние менструальной функции/ Menopausal status	Менопауза/Postmenopausal	56,2 % (72/128)
	Сохранена/Premenopausal	39,8 % (51/128)
Неoadъювантная химиотерапия/ Neoadjuvant chemotherapy	Проводилась/Yes	21,1 % (27/128)
	Не проводилась/No	58,6 % (75/128)
Степень злокачественности/ Degree of malignancy	1	11,7 % (15/128)
	2	66,4 % (85/128)
	3	7,8 % (10/128)
Наличие рецидивов/ Relapse	Есть/Yes	4,7 % (6/128)
	Нет/No	95,3 % (122/128)

информированном согласии больных и одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 10 от 24.04.15).

Методом дезагрегации из 128 образцов свежемороженого опухолевого материала с помощью BD Medimachine System (BD, USA) были изготовлены клеточные суспензии. Общая клеточность полученных суспензий определялась с помощью Scepter Cell Counter (Merck-Millipore, USA). После Fc-блокирования клеточного концентрата раствором Human TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking Solution (Biolegend, San Diego, CA, USA) добавляли моноклональные антитела: APC/Cy7 anti-human CD45 (Clone: HI30, Sony Biotechnology, USA), APC anti-human CD34 (Clone: 581, Sony Biotechnology, USA), Alexa Fluor488 anti-human CD202b (Tie2/

Tek) (Clone: 33.1 (Ab33), Sony Biotechnology, USA), PE/Cy7 anti-human CD11b (Clone: ICRF44, Sony Biotechnology, USA), Purified anti-human CD90 (Thy1) (Clone: 5E10, Sony Biotechnology, USA), BV786 Mouse anti-Human CD133 (Clone: 293C3, BD Opti Build, USA), PerCP/Cy5.5 anti-human CD326 (EpcAM) (Clone: 9C4, Sony Biotechnology, USA). Жизнеспособные клетки определяли с помощью 7-аминоактиномицина D (7-AAD, Sony Biotechnology, San Jose, CA, США). После инкубации эритроциты лизировали буфером OptiLyse (Beckman Coulter, Марсель, Франция) и промывали в буфере Cell Wash (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США). Был проведен контроль качества антител. К контрольному образцу добавляли изотипные контрольные антитела в той же концентрации. Иденти-

Таблица 2/Table 2

**Иммунофенотипирование клеток-предшественников
Immunophenotyping of progenitor cells**

Популяция клеток-предшественников/ Progenitor cell subset	Иммунофенотип/Immunophenotype
HSPCs	CD45 _{low} CD34 + CD202-
EPCs	CD45-CD133 + или CD34 + CD202 +
MSCs	CD45-CD133-CD90 +
MPs	CD45 _{low} CD133 + CD11b +

Таблица 3/Table 3

**Количество HSPCs, EPCs, MSCs и MPs в первичной опухоли больных ИПКНТ
HSPCs, EPCs, MSCs and MPs count in primary tumor of patients with IC NST**

Тип клеток/Cells type	Количество, Ме (Q1-Q3)/Count, Me (Q1-Q3)
HSPCs	0,54 (0,22–3,06) p ₁₋₂ =0,048; p ₁₋₃ <0,001; p ₁₋₄ =0,014
EPCs	0,35 (0,19–0,93) p ₂₋₃ <0,001; p ₂₋₄ =0,733
MSCs	4,47 (1,63–12,77) p ₃₋₄ <0,001
MPs	0,30 (0,14–1,07)

Примечание: p – статистическая значимость различий количества популяций клеток-предшественников в первичной опухоли больных ИПКНТ.

Note: p – statistical significance of progenitor cells subsets' count in primary tumor of patients with IC NST.

Таблица 4/Table 4

**Комбинации различных клеток-предшественников в ткани первичной опухоли менопаузальных больных ИПКНТ в зависимости от статуса лимфогенного метастазирования
Combinations of various progenitor cells subsets in primary tumor of menopausal patients with IC NST depending on the presence of lymphogenic metastasis**

Комбинации клеток-предшественников/ Progenitor cells phenotype combinations	Количество клеток, Ме (Q ₁ -Q ₃)/ Cell count, Me (Q1-Q3)	
	Лимфогенные метастазы отсутствуют/ Absence of lymphogenic metastasis (n=15)	Лимфогенные метастазы присутствуют/ Presence of lymphogenic metastasis (n=9)
HSPCs + EPCs + MSCs	4,22 (1,82–12,64)	6,23 (3,27–16,85) p=0,297
HSPCs + MPs + MSCs	4,81 (1,77–12,98)	6,74 (3,25–16,38) p=0,330
EPCs + MPs + MSCs	4,63 (1,72–9,73)	6,97 (2,89–13,07) p=0,525
HSPCs + EPCs + MPs	0,93 (0,56–2,34)	2,14 (1,40–5,07) p=0,110
HSPCs + EPCs	0,59 (0,42–1,75)	1,85 (0,94–4,25) p=0,088
HSPCs + MSCs	4,07 (1,58–12,24)	5,25 (3,15–16,12) p=0,365
HSPCs + MPs	0,60 (0,26–1,46)	1,93 (1,19–3,83) p=0,049
EPCs + MPs	0,65 (0,42–1,32)	0,63 (0,37–2,16) p=0,868
EPCs + MSCs	3,90 (1,65–8,81)	5,59 (2,43–12,62) p=0,664
MSCs + MPs	4,48 (1,49–9,33)	5,95 (2,73–11,83) p=0,616

Примечание: p – статистическая значимость различий по сравнению с группой без лимфогенных метастазов.

Note: p – statistical significance comparing to the patients group with absence of lymphogenic metastasis.

фикацию клеток проводили по иммунофенотипам, представленным в табл. 2. Относительное количество клеток-предшественников рассчитывали и выражали в клетках на 100 опухолевых клеток.

Для статистической обработки данных использован пакет программ IBM SPSS Statistics 22.0 (Armonk, USA). Нормальность распределения количественных показателей оценивали при помощи критерия Шапиро–Уилка. Параметры, не подчиняющиеся нормальному закону распределения, описывали с помощью медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q1–Q3). Для сравнения частот встречаемости использовался точный критерий Фишера. Оценка достоверности различий между двумя независимыми выборками осуществлялась при помощи критерия Манна–Уитни. Для оценки различий параметров нескольких независимых выборок применяли критерий Краскела–Уоллиса. Однофакторный и многофакторный регрессионный анализ использовался для оценки влияния факторов на риск события. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Исследованы особенности клеточного состава опухолевой ниши ИПКНТ. Первоначально оценивались частота и количество HSPCs, EPCs, MSCs и MPs в ткани первичной опухоли. Установлено, что в исследуемых образцах первичной опухоли HSPCs, EPCs, MSCs и MPs присутствовали в 100 % случаев ($p < 0,05$). Количество каждой популяции клеток-предшественников стандартизовано на 100 опухолевых клеток. Самой представительной клеточной популяцией являлись MSCs – 4,47 (1,63–12,77) клеток. Далее, в порядке убывания количества: HSPCs – 0,54 (0,22–3,06) клеток, EPCs – 0,35 (0,19–0,93) клеток и MPs – 0,30 (0,14–1,07) клеток ($p < 0,05$) (табл. 3). Стоит отметить, что количество HSPCs было значительно больше, чем EPCs и MPs ($p < 0,05$), а значения EPCs и MPs не различались между собой ($p > 0,05$). Значительное преобладание MSCs в ткани первичной опухоли представляется закономерным, поскольку данная клеточная популяция является предшественником фибробластов, формирующих строму опухоли.

Индикатором прогрессирования опухолевого процесса были выбраны метастатический статус регионарных лимфатических узлов и размер первичного опухолевого узла. Следует подчеркнуть, что в исследовании оценивалась связь не только отдельных популяций клеток-предшественников, но и сумм их различных комбинаций с параметрами опухолевой прогрессии (табл. 4 и 7), поскольку, как полагают, опухолевая ниша – это, прежде всего, совокупность клеток.

Установлено, что количество отдельных популяций клеток-предшественников и количество различных комбинаций клеток-предшественников не были ассоциированы с метастатическим стату-

сом регионарных лимфоузлов у больных ИПКНТ ($p > 0,05$). Однако, учитывая возможное влияние отсутствия репродуктивной функции больных ИПКНТ на прогрессирование заболевания, в связи с резким изменением гормонального фона женщины, количественные показатели различных комбинаций клеток-предшественников также были рассчитаны в группе менопаузальных больных (табл. 4). Было установлено, что в ткани первичной опухоли у пациенток, находящихся в менопаузальном периоде, количество HSPCs + MPs было значительно больше при наличии лимфогенных метастазов по сравнению с пациентками, у которых лимфогенные метастазы отсутствовали ($p = 0,049$). Стоит отметить, что в группе пациенток с сохраненной менструальной функцией различия в количестве различных комбинаций клеток-предшественников не обнаружено ($p > 0,05$).

Данные Рос-анализа подтвердили наличие ассоциативной связи между статусом регионарных лимфоузлов и количественным значением комбинации HSPCs + MPs в ткани ИПКНТ (рис. 1). С риском развития лимфогенных метастазов ассоциировано наличие в опухоли менопаузальных больных с люминальным РМЖ совокупности HSPCs и MPs в количестве, превышающем 1,24 клетки на 100 опухолевых клеток. Однофакторный и многофакторный анализ показали, что сумма HSPCs + MPs, превышающая 1,24 клетки на 100 опухолевых клеток, является независимым и не-

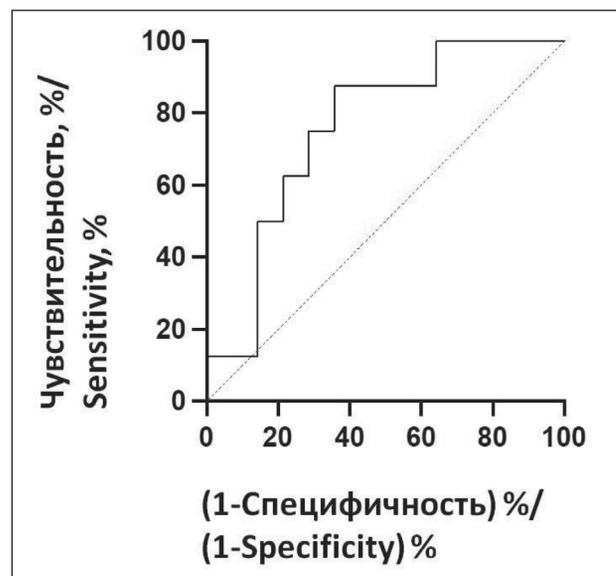


Рис. 1. ROC-кривая предиктивной значимости количества HSPCs + MPs для определения наличия лимфогенных метастазов.

Площадь под кривой – 0,758 (95 % ДИ 0,553–0,937), $p = 0,048$.

Пороговое значение параметра – 1,24 клетки, чувствительность – 75 %, специфичность – 71 %

Fig. 1. ROC curve of the predictive significance of HSPCs + MPs cells count for defining the presence of lymphogenic metastasis. Area under the curve – 0,758 (95 % CI 0,553 – 0,937), $p = 0,048$.

Cut-off of the parameter – 1,24 cells, sensitivity – 75 %, specificity – 71 %

Таблица 5/ Table 5

Анализ предикторной значимости клинко-патологических параметров и отдельных компонентов опухолевой ниши в определении статуса лимфогенного метастазирования больных ИПКНТ
Analysis of predictive significance of clinicopathological parameters and certain elements of tumor niche in determination of lymphogenic metastasis in patients with IC NST

Параметры/Parameters	Однофакторный анализ/ Univariate analysis		Многофакторный анализ/ Multivariate analysis	
	ОШ (95 % ДИ)/ OR (95 % CI)	p-value	ОШ (95 % ДИ)/ OR (95 % CI)	p-value
Возраст больных <50 vs ≥ 50/ Patients' age <50 vs ≥ 50	1,23 (0,69–2,15)	0,498	1,23 (0,69–2,19)	0,487
Распространенность опухолевого процесса T1–2 vs T3–4 / Extension of the primary tumor T1–2 vs T3–4	1,54 (0,96–2,47)	0,075	1,55 (0,96–2,50)	0,071
Степень злокачественности 1–2 vs 3 / Grade of malignancy 1–2 vs 3	1,34 (0,69–2,59)	0,380	1,19 (0,24–5,83)	0,831
Экспрессия Ki67 <20 vs ≥20 / Ki67 expression <20 vs ≥20	1,00 (0,98–1,02)	0,733	1,04 (0,97–1,12)	0,295
Her2/neu 1(нет) vs 2(есть) / Her2/neu 1(no) vs 2(yes)	0,92 (0,63–1,35)	0,680	0,44 (0,15–1,29)	0,137
Сумма HSPCs + MPs, стандартизация на 100 опухолевых клеток <1,24 vs >1,24 / HSPCs + MPs total sum, standartization on 100 tumor cells <1.24 vs >1.24	3,29 (1,09–42,18)	0,041	2,96 (1,05–41,73)	0,040

Таблица 6/ Table 6

Количество HSPCs, EPCs, MSCs и MPs в первичной опухоли больных ИПКНТ в зависимости от размера опухоли
HSPCs, EPCs, MSCs and MPs count in primary tumor of patients with IC NST depending on tumor size

Тип клеток/Cells type	Количество клеток, Ме (Q ₁ -Q ₃)/Cell count, Me (Q1-Q3)	
	До 2 см/<2 cm (n=33)	2–5 см/2–5 cm (n=83)
MSCs	5,10 (1,46–16,83)	5,01 (1,85–12,73) p=0,764
HSPCs	0,32 (0,16–0,74)	0,84 (0,25–3,99) p=0,126
EPCs	0,23 (0,06–0,75)	0,39 (0,22–1,16) p=0,214
MPs	0,15 (0,03–0,50)	0,50 (0,19–1,59) p=0,058

Примечание: p – статистическая значимость различий по сравнению с группой – размер первичной опухоли до 2 см.

Note: p – statistical significance comparing to the patients group with the primary tumor size of less than 2 cm.

благоприятным признаком высокого риска лимфогенного метастазирования (табл. 5).

Далее оценивалась связь количества отдельных популяций HSPCs, EPCs, MSCs и MPs в ткани ИПКНТ и размера первичного опухолевого узла (табл. 6). Установлено, что на уровне тенденции величина первичной опухоли связана с количеством MPs. Их большее количество наблюдалось у пациенток с большим размером первичной опухоли (p=0,058). Также важно было установить, ассоциированы ли количественные показатели различных комбинаций клеток-предшественников в ткани первичной опухоли с ее размером (табл. 7). Нами показано, что с большим размером первичного опу-

холевого узла связано присутствие в опухолевой нише HSPCs и MPs (p=0,039). Кроме того, EPCs, в совокупности с вышеуказанными клеточными популяциями, также могут способствовать формированию опухоли большего размера на уровне тенденции (HSPCs + EPCs + MPs, p=0,058; EPCs + MPs, p=0,078; HSPCs + EPCs, p=0,088).

Предикторная ценность суммы HSPCs и MPs подтверждена методом Рос-анализа (рис. 2). Наличие в микроокружении опухоли совокупности HSPCs и MPs в количестве, большем или равном 1,24 клетки при стандартизации на 100 опухолевых клеток, ассоциировано с большим размером первичного опухолевого узла у больных ИПКНТ.

Таблица 7/Table 7

Комбинации различных клеток-предшественников в ткани первичной опухоли больных ИПКНТ, взаимосвязь с размером опухоли

Combinations of various progenitor cells subsets in primary tumor of patients with IC NST, association with tumor size

Комбинации клеток-предшественников/ Progenitor cells phenotype combinations	Количество клеток, Ме (Q ₁ -Q ₃)/ Cell count, Me (Q1-Q3)	
	До 2 см/< 2 см (n=33)	2–5 см/2–5 см (n=83)
HSPCs + EPCs + MSCs	5,75 (1,66–18,66)	6,95 (3,57–17,06) p=0,460
HSPCs + MPs + MSCs	5,73 (1,57–18,37)	7,29 (3,58–16,78) p=0,427
EPCs + MPs + MSCs	5,74 (1,58–17,66)	6,37 (3,24–14,96) p=0,604
HSPCs + EPCs + MPs	0,96 (0,23–2,10)	2,30 (0,95–6,29) p=0,058
HSPCs + EPCs	0,65 (0,21–1,76)	1,84 (0,60–5,09) p=0,088
HSPCs + MSCs	5,42 (1,55–18,10)	5,96 (3,43–15,51) p=0,530
HSPCs + MPs	0,63 (0,18–1,34)	2,02 (0,65–5,61) p=0,039
EPCs + MPs	0,47 (0,13–1,09)	0,91 (0,52–2,29) p=0,078
EPCs + MSCs	5,43 (1,56–17,39)	5,78 (2,25–13,90) p=0,139
MSCs + MPs	5,41 (1,47–17,10)	6,15 (2,91–13,79) p=0,196

Примечание: p – статистическая значимость различий по сравнению с группой – размер опухоли до 2 см.

Note: p – statistical significance comparing to the patients group with the primary tumor size of less than 2 cm.

Таблица 8/Table 8

Анализ предикторной значимости клиничко-морфологических параметров и отдельных компонентов опухолевой ниши в определении размера опухоли больных ИПКНТ

Analysis of predictive significance of clinicopathological parameters and certain elements of tumor niche in determination of tumor size in patients with IC NST

Параметры/Parameters	Однофакторный анализ/ Univariate analysis		Многофакторный анализ/ Multivariate analysis	
	ОШ (95 % ДИ)/ OR (95 % CI)	p-value	ОШ (95 % ДИ)/ OR (95 % CI)	p-value
Возраст больных <50 vs ≥ 50/Patients' age <50 vs ≥ 50	1,46 (0,80–2,64)	0,209	0,26 (0,02–3,69)	0,319
Сохранена менструальная функция vs менопауза/ Premenopausal vs postmenopausal	1,05 (0,53–2,07)	0,884	0,33 (0,09–1,15)	0,081
Экспрессия ER нет vs есть/ER expression no vs yes	1,13 (0,44–2,87)	0,797	0,36 (0,04–3,06)	0,351
Экспрессия PR нет vs есть/PR expression no vs yes	1,19 (0,56–2,53)	0,660	2,06 (0,50–8,48)	0,315
Экспрессия Ki67 <20 vs ≥20/Ki67 expression <20 vs ≥20	1,01 (0,99–1,03)	0,584	1,02 (0,98–1,05)	0,371
Her2neu нет vs есть/Her2/neu no vs yes	0,68 (0,46–1,01)	0,056	0,80 (0,49–1,31)	0,387
Степень злокачественности 1–2 vs 3 / Grade of malignancy 1–2 vs 3	1,10 (0,54–2,22)	0,790	0,85 (0,31–2,27)	0,739
Молекулярно-генетический тип Люм. А vs Люм. В/ Molecular subtype Luminal A vs Luminal B	0,96 (0,58–1,59)	0,879	0,93 (0,31–2,76)	0,893
НАХТ нет vs есть/Neoadjuvant chemotherapy no vs yes	0,67 (0,31–1,45)	0,314	0,91 (0,33–2,49)	0,859
Сумма HSPCs + MPs, стандартизация на 100 опухолевых клеток <1,24 vs >1,24/ HSPCs + MPs total sum, standartization on 100 tumor cells <1.24 vs >1.24	3,37 (1,11–62,84)	0,039	3,02 (1,03–73,82)	0,036

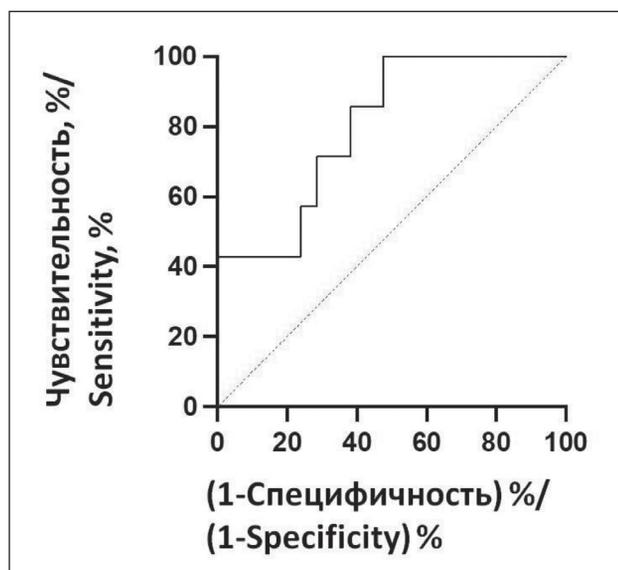


Рис. 2. ROC-кривая предиктивной значимости количества HSPCs + MPs для определения большего размера первичной опухоли. Площадь под кривой – 0,802 (95 % ДИ 0,627–0,978), $p=0,018$. Пороговое значение параметра – 1,24, чувствительность – 86 %, специфичность – 62 %

Fig. 2. ROC curve of the predictive significance count of HSPCs + MPs cells for defining the bigger size of tumor. Area under the curve – 0,802 (95 % CI 0,627–0,978), $p=0,018$. Cut-off of the parameter – 1,24 cells, sensitivity – 86 %, specificity – 62 %

Для того чтобы выявить предикторы большей величины первичной опухоли у больных ИПКНТ, был использован однофакторный и многофакторный регрессионный анализ (табл. 8), в результате которого были установлены параметры опухолевой ниши ИПКНТ, ассоциированной с прогрессированием заболевания, а именно: совокупное количество HSPCs и MPs в первичной опухоли пациенток более 1,24 клетки на 100 опухолевых клеток – независимый предиктор большего размера первичной опухоли ($p=0,036$), а также развития лимфогенного метастазирования ($p=0,040$).

Обсуждение

По данным литературы, в состав опухолевой ниши входят различные популяции клеток-предшественников, каждая из которых выполняет ряд определенных функций. Известно, что MSCs являются источником опухоль-ассоциированных фибробластов, которые участвуют в формировании стромы опухоли, синтезируют и моделируют волокнистый компонент стромы, а также синтезируют фибронектин. Кроме того, MSCs способствуют пролиферации и метастазированию опухолевых клеток, участвуя в процессах ангиогенеза и формирования иммуносупрессивного микроокружения опухоли [11, 12]. Ремоделированные участки, богатые фибронектином, являются привлекательными для HSPCs, рекрутированных из костного мозга [6]. HSPCs, в свою очередь, вырабатывают спектр цитокинов, под действием которых про-

исходит рекрутирование различных популяций клеток-предшественников из костного мозга как в первичный опухолевый очаг, так и в области потенциального формирования метастазов [7].

Немаловажным фактором для развития опухоли является образование в ней собственной сосудистой сети, в связи с чем присутствие EPCs в опухолевой нише закономерно. Интересно отметить, что целенаправленное рекрутирование EPCs из костного мозга наблюдается на стадии опухолевой прогрессии и прекращается в тот момент, когда опухоль перестает расти [13]. MPs дают начало опухоли-ассоциированным макрофагам (TAMs). TAMs являются наиболее распространенной клеточной популяцией, участвующей в процессе воспаления и инициирующей различные стадии развития рака молочной железы за счет участия в процессах ангиогенеза, инвазии опухоли и ремоделировании матрикса [14, 15]. Кроме того, TAMs вырабатывают эпидермальный фактор роста (EGF), который благоприятствует неконтролируемому росту и делению опухолевых клеток [10].

Однако до настоящего времени не установлено, какие совокупности клеток-предшественников, формирующих опухолевые ниши, являются ключевыми в процессах роста первичного опухолевого узла и развития лимфогенных метастазов. По данным исследования установлено, что большее количество HSPCs и MPs в опухолевой нише ассоциировано с большим размером первичного опухолевого узла.

В условиях хронического воспаления в микроокружении опухоли эндотелий микроциркуляторного русла экспрессирует на своей поверхности VCAM1, обладающий способностью связывать интегрин гемопоэтических клеток-предшественников (VLA4) [16]. Поступающие в очаг воспаления HSPCs секретируют спектр цитокинов, которые привлекают другие популяции клеток-предшественников, в том числе и MPs [17] как популяцию, вовлеченную в воспалительный процесс. Кроме того, имеются данные, согласно которым повышенное содержание M2 макрофагов в ткани опухоли молочной железы коррелирует с ее большим размером [18]. Формирование лимфогенных метастазов также было возможным только при наличии совокупности HSPCs и MPs, а не отдельных клеточных популяций в нише ИПКНТ. Данный результат подтверждает представления о том, что ниша – это совокупность клеток-предшественников, создающих оптимальные условия для роста и развития опухоли. Считается, что одной из причин смертности больных РМЖ является лимфогенная генерализация с канцероматозом плевры, поражением лимфоузлов средостения и массивным метастатическим поражением легких [19]. Полученные результаты могут послужить основой для понимания механизмов и разработки инструментов прогнозирования данной формы прогрессии.

Таким образом, две из четырех изучаемых популяций клеток-предшественников были значимо связаны с параметрами опухолевой прогрессии. Присутствие HSPCs и MPs в микроокружении опухоли было сопряжено с формированием первичного опухолевого узла большего размера и возникновением лимфогенных метастазов у больших ИПКНТ.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Harbeck N., Gnant M. Breast cancer. *Lancet*. 2017; 389(10074): 1134–50. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8.
2. Каприн А.Д., Александрова Л.М., Старинский В.В., Мамонтов А.С. Технологии диагностики и скрининга в раннем выявлении злокачественных новообразований. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2018; 7(1): 34–40. [Kaprin A.D., Aleksandrova L.M., Starinsky V.V., Mamontov A.S. Technologies for early diagnosis and screening in the early detection of malignant neoplasms. *P.A. Herzen Journal of Oncology*. 2018; 7(1): 34–40. (in Russian)]. doi: 10.17116/onkolog20187134-40.
3. Zaltnai A. Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. *Curr Mol Med*. 2006; 6(6): 685–93. doi: 10.2174/156652406778195053.
4. Psaila B., Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(4): 285–93. doi: 10.1038/nrc2621.
5. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2014; 4: 62. doi: 10.3389/fonc.2014.00062.
6. Luo H., Tu G., Liu Z., Liu M. Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Lett*. 2015; 361(2): 155–63. doi: 10.1016/j.canlet.2015.02.018.
7. Karnoub A.E., Dash A.B., Vo A.P., Sullivan A., Brooks M.W., Bell G.W., Richardson A.L., Polyak K., Tubo R., Weinberg R.A. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007; 449(7162): 557–63. doi: 10.1038/nature06188.
8. Sepúlveda P., Martínez-León J., García-Verdugo J.M. Neoangiogenesis with endothelial precursors for the treatment of ischemia. *Transplant Proc*. 2007; 39(7): 2089–94. doi: 10.1016/j.transproceed.2007.07.009.
9. Timmermans F., Plum J., Yöder M.C., Ingram D.A., Vandekerckhove B., Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*. 2009; 13(1): 87–102. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00598.x.
10. Lewis C.E., Pollard J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006; 66(2): 605–12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4005.

Заключение

Опухолевая ниша с наличием в ее составе HSPCs и MPs связана с формированием первичного опухолевого узла большего размера и риском развития лимфогенных метастазов у больших ИПКНТ.

11. Cuijffo B.G., Karnoub A.E. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adh Migr*. 2012; 6(3): 220–30. doi: 10.4161/cam.20875.
12. Nishimura K., Semba S., Aoyagi K., Sasaki H., Yokozaki H. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology*. 2012; 79(6): 290–306. doi: 10.1159/000337296.
13. Botelho M.C., Alves H. Endothelial Progenitor Cells in Breast Cancer. *Int J Immunother Cancer Res*. 2016; 2: 1–2.
14. Sica A., Larghi P., Mancino A., Rubino L., Porta C., Totaro M.G., Rimoldi M., Biswas S.K., Allavena P., Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*. 2008; 18(5): 349–55. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.004.
15. Noy R., Pollard J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014; 41(1): 49–61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
16. Fox J.M., Chamberlain G., Ashton B.A., Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol*. 2007; 137(6): 491–502. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06610.x.
17. Oberoi P., Kamenjarin K., Ossa J.F.V., Uherek B., Bönig H., Wels W.S. Directed Differentiation of Mobilized Hematopoietic Stem and Progenitor Cells into Functional NK cells with Enhanced Antitumor Activity. *Cells*. 2020; 9(4): 811. doi: 10.3390/cells9040811.
18. Jayasingam S.D., Citartan M., Thang T.H., Mat Zin A.A., Ang K.C., Ch'ng E.S. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol*. 2020; 9: 1512. doi: 10.3389/fonc.2019.01512.
19. Klimek M. Pulmonary lymphangitis carcinomatosa: systematic review and meta-analysis of case reports, 1970–2018. *Postgrad Med*. 2019; 131(5): 309–18. doi: 10.1080/00325481.2019.1595982.

Поступила/Received 09.06.2022
 Одобрена после рецензирования/Revised 12.09.2022
 Принята к публикации/Accepted 29.09.2022

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бузенкова Ангелина Владиславовна, младший научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 7187-6449. Researcher ID (WOS): AAB-3089-2019. Author ID (Scopus): 57203807052. ORCID: 0000-0001-5100-3592.

Таширева Любовь Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 4371-5340. Researcher ID (WOS): C-8222-2012. Author ID (Scopus): 55234960400. ORCID: 0000-0003-2061-8417.

Завьялова Марина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; заведующая кафедрой патологической анатомии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). SPIN-код: 1229-0323. Researcher ID (WOS): C-8580-2012. Author ID (Scopus): 36711031100. ORCID: 0000-0001-9429-9813.

Перельмутер Владимир Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 6252-5319. Researcher ID (WOS): C-8227-2012. Author ID (Scopus): 8091317300. ORCID: 0000-0002-7633-9620.

ВКЛАД АВТОРОВ

Бузенкова Ангелина Владиславовна: проведение проточной цитометрии, статистическая обработка результатов, написание статьи.

Таширева Любовь Александровна: статистическая обработка результатов, написание статьи.

Завьялова Марина Викторовна: редактирование статьи, обсуждение результатов.

Перельмутер Владимир Михайлович: редактирование статьи, обсуждение результатов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 19-75-30016; Оборудование ЦКП «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Angelina V. Buzenkova, MD, Junior Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): AAB-3089-2019. Author ID (Scopus): 57203807052. ORCID: 0000-0001-5100-3592.

Lyubov A. Tashireva, MD, PhD, Senior Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8222-2012. Author ID (Scopus): 55234960400. ORCID: 0000-0003-2061-8417.

Marina V. Zavyalova, MD, DSc, Professor, Leading Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Head of the Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8580-2012. ORCID: 0000-0001-9429-9813. Author ID (Scopus): 36711031100.

Vladimir M. Perelmuter, MD, DSc, Professor, Chief Researcher of the Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8227-2012. ORCID: 0000-0002-7633-9620. Author ID (Scopus): 8091317300.

AUTHOR CONTRIBUTION

Angelina V. Buzenkova: flow cytometry, statistical processing of the results, writing the article.

Lyubov A. Tashireva: statistical processing of the results, writing the article.

Marina V. Zavyalova: editing the article, discussion of the results.

Vladimir M. Perelmuter: editing the article, the discussion of the results.

Funding

The study was carried out within the framework of the Russian Science Foundation grant No. 19-75-30016; Equipment of the Center for Collective Use «Medical Genomics» of the Tomsk NIMC.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.