

Результаты изучения иммунофенотипа рака молочной железы и его взаимосвязь с показателями гемопоэза

Д.А. Рябчиков¹, С.В. Чулкова^{✉1,2}, Ф.А. Шамилов¹, Н.В. Чантурия^{1,3}, С.Д. Желтиков^{1,3}, Н.Н. Тупицын¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация

Обоснование. Использование иммунотерапевтических подходов в лечении рака требует глубокого и всестороннего понимания биологических особенностей опухоли. В этой связи изучение иммунофенотипа опухоли является одним из ведущих научных направлений. Молекулы главного комплекса гистосовместимости рассматриваются как перспективные маркеры предсказания эффективности иммунотерапии.

Цель. Изучить иммунофенотип опухоли при различных молекулярных подтипах рака молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. В исследование включены 99 больных РМЖ. Люминальный рак – 84,8% (n=83), Erb-B2 сверхэкспрессирующий (HER2+) подтип – 5,0% случаев (n=5), трижды негативный подтип РМЖ – 10,2% (n=10). Стадии: T1 (51,5%), T2 (44,4%), T3 (2,0%). Метастатическое поражение лимфоузлов (N+) отмечено в 39,4% (n=39) случаев. Степень злокачественности в 80,8% соответствовала G2. Изучены образцы опухолевой ткани и костного мозга. Иммунофенотипирование опухоли проводилось на криостатных срезах методом иммунофлуоресценции. Использованы антитела к HLA-I, HLA-DR, CD71, напрямую конъюгированные с флуорохромами PE, FITC, PE-Cy5. Костный мозг изучался морфологическим методом с применением световой микроскопии. Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM-SPSS Statistics v.21.

Результаты. При люминальном РМЖ (ЛРМЖ) в 50,8% (31/61) случаев молекула HLA-I на мембране отсутствует или экспрессируется единичными опухолевыми клетками. Снижение уровней экспрессии HLA-I при люминальном подтипе сочеталось с отсутствием антигенов HLA-DR, что установлено в 63,1% случаев. Более высокая частота экспрессии HLA-I наблюдается при Erb-B2 сверхэкспрессирующем и трижды негативном подтипе РМЖ; $p>0,05$. Экспрессия CD71 выявлена в 67,8% (40/59) исследуемых образцов люминального подтипа. При трижды негативном подтипе РМЖ установлено, что CD71 экспрессируется на поверхности большинства опухолевых клеток (70%). Статистически значимых различий между изученными молекулярными подтипами РМЖ не выявлено. Анализ в пределах люминальных подтипов выявил, что при B-подтипах экспрессия CD71 наблюдалась гораздо чаще: 76,5% (n=26) и 75% (n=3) против 52,4% (n=11). HLA-I экспрессирующие опухоли люминального рака характеризовались более высокими уровнями эритроидных предшественников (полихроматофильных нормобластов $9,0\pm 0,9$ и $5,8\pm 0,8\%$, $p=0,017$; оксифильных нормобластов $7,9\pm 0,7$ и $5,3\pm 0,6\%$, $p=0,008$), увеличением суммы клеток эритроидного ростка ($17,7\pm 1,5$ и $11,6\pm 1,5\%$, $p=0,009$) и повышенным содержанием миелокариоцитов ($93,1\pm 17,1$ тыс/мкл против $57,3\pm 9,0$ тыс/мкл, $p=0,083$).

Заключение. При ЛРМЖ отмечено снижение уровней экспрессии молекул HLA I класса в сочетании с отсутствием на мембране опухолевых клеток антигенов HLA-DR, что наблюдалось в более чем 1/2 анализируемых образцов. Частота экспрессии при трижды негативном раке выше, чем при люминальном подтипе. Статистически значимых различий между молекулярными подтипами в уровне экспрессии молекул HLA I и II класса не выявлено. Экспрессия трансферринового рецептора отмечена в большинстве случаев трижды негативного подтипа РМЖ. Установлена связь экспрессии молекул гистосовместимости HLA-I с показателями гемопоэза при ЛРМЖ.

Ключевые слова: люминальный рак молочной железы, иммунофенотип, HLA-I, HLA-II, CD71, костный мозг, гемопоэз

Для цитирования: Рябчиков Д.А., Чулкова С.В., Шамилов Ф.А., Чантурия Н.В., Желтиков С.Д., Тупицын Н.Н. Результаты изучения иммунофенотипа рака молочной железы и его взаимосвязь с показателями гемопоэза. Современная Онкология. 2021; 23 (2): 275–279. DOI: 10.26442/18151434.2021.2.200958

Информация об авторах / Information about the authors

✉ Чулкова Светлана Васильевна – канд. мед. наук, доц., ст. науч. сотр. лаб. иммунологии гемопоэза НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», доц. каф. онкологии и лучевой терапии ФГАУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова». E-mail: chulkova@mail.ru; ORCID: 0000-0003-4412-5019

Рябчиков Денис Анатольевич – д-р мед. наук, зав. отд-нием хирургического лечения опухолей молочной железы №16 НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: dr.denisr@mail.ru; ORCID: 0000-0003-2670-2361

Шамилов Фархад Азерович – канд. мед. наук, врач-онколог отд-ния хирургического лечения опухолей молочной железы №16 НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: farkhad8282@gmail.com

Чантурия Нашль Валерьевна – аспирант каф. ФДПО онкологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова», врач-онколог хирургического отд-ния №16 НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: naily.chanturiya@gmail.com; ORCID: 0000-0001-7903-6417

Желтиков Сергей Дмитриевич – ординатор каф. ФДПО онкологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова», ординатор хирургического отд-ния №16 НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: dr.zheltikov@mail.ru; ORCID: 0000-0002-5292-5924

Тупицын Николай Николаевич – д-р мед. наук, проф., рук. лаб. иммунологии гемопоэза НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: nntca@yahoo.com; ORCID: 0000-0003-3966-128X

✉ Svetlana V. Chulkova – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Pirogov Russian National Research Medical University. E-mail: chulkova@mail.ru; ORCID: 0000-0003-4412-5019

Denis A. Ryabchikov – D. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: dr.denisr@mail.ru; ORCID: 0000-0003-2670-2361

Farhad A. Shamilov – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: farkhad8282@gmail.com

Nail V. Chanturiya – Graduate Student, Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: naily.chanturiya@gmail.com; ORCID: 0000-0001-7903-6417

Sergey D. Zheltikov – Resident, Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: dr.zheltikov@mail.ru; ORCID: 0000-0002-5292-5924

Nikolai N. Tupitsyn – D. Sci. (Med.), Prof., Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: nntca@yahoo.com; ORCID: 0000-0003-3966-128X

Breast cancer immunophenotype and its relationship with haematopoiesis

Denis A. Ryabchikov¹, Svetlana V. Chulkova^{1,2}, Farhad A. Shamilov¹, Nail V. Chanturia^{1,3}, Sergey D. Zheltikov^{1,3}, Nikolay N. Tupitsyn¹

¹Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

³Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

Abstract

Background. The applying of immunotherapeutic approaches in cancer treatment requires a deep and comprehensive understanding of the tumor biological characteristics. In this regard, the study of the tumor immunophenotype is one of the leading scientific directions. The major histocompatibility complex molecules are considered to be the promising markers of the immunotherapy effectiveness prediction.

Aim. To research tumor immunophenotype in different molecular subtypes of breast cancer (BC).

Materials and methods. The study included 99 patients with BC. Luminal cancer – 84.8% (n=83), Erb-B2 overexpressing (HER2+) subtype – 5.0% of cases (n=5), triple-negative BC – 10.2% (n=10). Stages: T1 (51.5%), T2 (44.4%), T3 (2.0%). Lymph node metastases (N+) were present in 39.4% (n=39) of cases. Grade of malignancy: 80.8% (G2). Samples of tumor tissue and bone marrow were examined. Immunophenotyping of the tumor was carried out on cryostat sections by the method of immunofluorescence. Antibodies to HLA-I, HLA-DR, CD71 were used and were directly conjugated to fluorochromes PE, FITC, PE-Cy5. The bone marrow was examined by a morphological method using light microscopy. Statistical data processing was performed using the IBM-SPSS statistics v2.1.

Results. In 50.8% (31/61) cases of luminal BC (LBC), the HLA-I molecule is absent on the membrane or is expressed by single tumor cells. A decrease in HLA-I expression levels in the luminal subtype was combined with the absence of HLA-DR antigens, which was found in 63.1% of cases. A higher frequency of HLA-I expression is observed in the Erb-B2 overexpressing BC, the differences are insignificant. Expression of CD71 was detected in 67.8% (40/59) of the studied samples of LBC. CD71 was expressed on the surface of most tumor cells (70%) in triple-negative BC. There were no statistically significant differences between the studied molecular subtypes of BC. Analysis of the luminal subtypes revealed that CD71 expression was observed much more often in luminal B subtype: 76.5% (n=26) and 75% (n=3) versus 52.4% (n=11). HLA-I expressing luminal cancer were characterized by higher levels of erythroid precursors (polychromatophilic normoblasts 9.0 ± 0.9 and $5.8 \pm 0.8\%$, $p=0.0017$; oxyphilic normoblasts 7.9 ± 0.7 and $5.3 \pm 0.6\%$, $p=0.008$), an increase in the amount of erythroid germ cells (17.7 ± 1.5 and $11.6 \pm 1.5\%$, $p=0.009$) and an increased content of myelokaryocytes (93.1 ± 17.1 thousand/ μ l versus 57.3 ± 9.0 thousand/ μ l, $p=0.083$).

Conclusion. In LBC a decrease in the expression levels of HLA-I class molecules was noted in combination with the absence of HLA-DR antigens on the membrane of tumor cells, which was observed in more than half of the analyzed samples. The frequency of expression in triple-negative cancer is higher than in the luminal subtype. There were no statistically significant differences between molecular subtypes by the level of expression of HLA-I and II class molecules. Transferrin receptor expression has been reported in most cases of triple-negative BC subtype. The interconnection between the expression of HLA-I histocompatibility molecules and hematopoietic parameters in LBC has been established.

Keywords: luminal breast cancer, immunophenotype, HLA-I, HLA-II, CD71, bone marrow, hematopoiesis

For citation: Ryabchikov DA, Chulkova SV, Shamilov FA, Chanturia NV, Zheltikov SD, Tupitsyn NN. Breast cancer immunophenotype and its relationship with haematopoiesis. *Journal of Modern Oncology*. 2021; 23 (2): 275–279. DOI: 10.26442/18151434.2021.2.200958

Введение

Рак молочной железы (PMЖ) является лидирующей онкопатологией у женщин во всем мире. Современные стратегии, включающие адъювантные и неoadъювантные режимы системной терапии, позволяют добиться довольно хороших результатов лечения [1, 2]. Такие успехи стали возможны благодаря внедрению новых стандартов лечения, которые базируются на определении молекулярных маркеров, позволяющих уточнить подтипы PMЖ и подобрать наиболее оптимальный вид терапии. Наряду с этим важным является установление иммунологических маркеров, характеризующих фундаментальные биологические свойства опухоли с позиций уклонения от иммунного контроля. Ключевыми среди иммунологических маркеров считаются молекулы главного комплекса гистосовместимости (HLA I и II класса), которые, являясь примитивными рецепторами для антигенных пептидов, опосредуют Т-клеточный противоопухолевый ответ [3].

В норме антигены главного комплекса гистосовместимости экспрессируются на всех ядросодержащих клетках, включая эпителиоциты молочной железы. Утрата данных молекул, частичная или полная, может наблюдаться при различных злокачественных опухолях, в том числе при PMЖ [4, 5]. Потеря экспрессии HLA-детерминант или ее подавление на опухолевых клетках представляет собой механизм, позволяющий клеткам рака уклоняться от уничтожения цитотоксическими Т-лимфоцитами, что делает возможным распространение опухоли и метастазирование [4].

По мнению исследователей, экспрессия HLA-детерминант может различаться при подтипах PMЖ и коррелировать с от-

ветом на проводимое лекарственное лечение, выживаемостью больных [6]. Поэтому значительная доля научных изысканий посвящена изучению антигенов HLA I и II класса, клиническая значимость экспрессии которых при PMЖ до сих пор является предметом напряженных дискуссий [7].

Не меньший научный интерес вызывает рецептор трансферрина CD71, экспрессия которого придает ростовые преимущества опухолевой клетке [8, 9]. В работе Е.В. Артамоновой продемонстрирована его роль как фактора неблагоприятного прогноза при PMЖ [9]. При оценке отдаленных результатов лечения авторами установлено, что отсутствие на мембране опухолевых клеток трансферринового рецептора ассоциируется с более высокой общей и безрецидивной выживаемостью, тогда как фенотип опухоли, характеризующийся мономорфной или даже мозаичной экспрессией CD71, коррелирует с ухудшением показателей выживаемости.

Новым аспектом научных исследований в последние годы стало изучение костного мозга при злокачественных опухолях, которое выявило особенности гемопоэза. Установлены изменения показателей кроветворения при целом ряде опухолей: меланоме, раке яичников, раке легкого, PMЖ [10–13]. Обсуждается их связь с клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

Изучение экспрессии молекулярных детерминант HLA I и II класса, рецептора трансферрина при различных молекулярных подтипах PMЖ может помочь раскрыть специфические биологические свойства опухоли и найти пути коррекции этих нарушений с помощью иммунотерапевтических подходов в будущем.

Материалы и методы

Материалом данного исследования послужили образцы опухолевой ткани и костного мозга. Всего включены 99 больных РМЖ, которые прошли обследование и получили лечение в условиях ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Возраст больных варьировал от 26 до 83 лет, средний возраст – 54,9±11,2 года. Диагноз у всех больных поставлен на основании клинических, рентгенологических и морфологических данных. Люминальный РМЖ (ЛРМЖ) диагностирован у 84,8% (n=83) больных, из которых у 39,7% (n=33) верифицирован люминальный подтип А; у 49,5% (n=41) – В-HER2-негативный подтип; у 10,8% (n=9) – В-HER2-позитивный подтип. Erb-B2 сверхэкспрессирующий (HER2+) подтип РМЖ диагностирован в 5,0% случаев (n=5), трижды негативный подтип РМЖ – в 10,2% (n=10); рис. 1. В соответствии с данными патоморфологического исследования в большинстве случаев РМЖ соответствовал стадии Т1 (51,5%) и Т2 (44,4%), стадия Т3 установлена у 2,0% больных. Метастатическое поражение лимфоузлов (N+) наблюдалось в 39,4% (n=39), в остальных случаях лимфоузлы интактны (N0). Чаще всего степень злокачественности опухоли соответствовала G2 (80,8%).

Имунофенотипирование опухоли и исследование костного мозга выполняли в лаборатории иммунологии гемопоэза НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Имунофенотипирование проводилось на криостатных срезах методом иммунофлуоресценции. Криостатные срезы, помещенные на предметные стекла, фиксировали в течение 10 мин в ацетоне при температуре 4°C. Затем отмывали в среде 199 (pH 7,2–7,4) и наносили моноклональные антитела. Инкубировали 30 мин, повторно отмывали и наносили ФИТЦ-меченные F(ab)2 – фрагменты антисыворотки. После инкубации и отмывания препараты консервировали 50% глицерином на физиологическом растворе. Готовые препараты закрывали покровными стеклами. Учет реакции выполняли на люминисцентном микроскопе ZEISS (AXIOSKOP, Германия) полуколичественным методом. Частичная/выраженная реакция: 10–80% клеток или все опухолевые клетки экспрессируют анализируемый антиген. Отрицательная реакция: обнаруживались единичные антигенположительные опухолевые клетки либо констатировалось полное отсутствие экспрессии изучаемого антигена. Изучена экспрессия опухолевыми клетками молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-I, HLA-DR, рецептора трансферрина CD71. Прямые конъюгаты антител с флуорохромами PE, FITC, PE-Cy5 произведены фирмами Beckman Coulter и Becton Dickinson (США).

Для исследования костного мозга применялся морфологический метод. Костный мозг получен стерильной пункцией. Из каждого пунктата изготавливали по 6 препаратов, которые окрашивали по Романовскому. Оценка клеточности костного мозга осуществлялась на гематологическом анализаторе. При световой микроскопии врачами-морфологами производился подсчет клеточных элементов миелограммы, а также поиск комплексов опухолевых клеток с целью исключения метастатического поражения костного мозга.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM-SPSS Statistics v. 21. Осуществляли анализ корреляций по Пирсону или Спирмену, подсчет распределения частот по категориям с непрерывными и дискретными переменными (критерий Фишера и χ^2 по Пирсону). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучена экспрессия HLA I и II класса при люминальном, Erb-B2 сверхэкспрессирующем и трижды негативном молекулярных подтипах РМЖ. Данные сравнения экспрессии молекул HLA I класса, HLA-DR всех трех групп подтипов РМЖ представлены в табл. 1.

При изучении экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости установлено, что в 50,8% (31/61) случаев при ЛРМЖ антиген HLA I класса на мембране отсутствует или экспрессируется единичными опухолевыми клетками. Экспрессия данной молекулы всеми клетками образца или частью отмечена в 49,2% случаев. Снижение уровней экспрессии молекул HLA I класса сочеталось с отсутствием на мембране опухолевых клеток антигенов HLA-DR, которые являются

Рис. 1. Распределение больных в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ.
Fig. 1. The distribution of patients depending on the molecular subtype of BC.

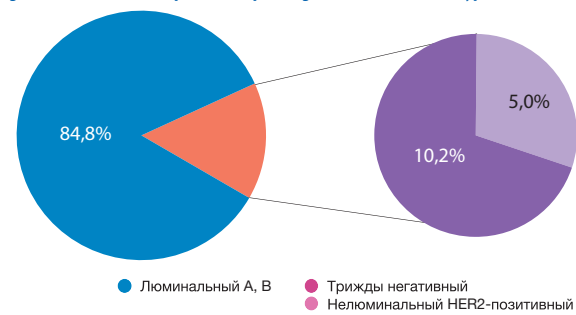
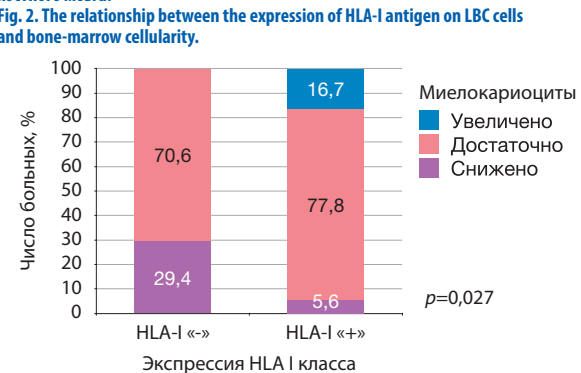


Рис. 2. Взаимосвязь экспрессии антигена HLA-I на клетках ЛРМЖ с клеточностью костного мозга.
Fig. 2. The relationship between the expression of HLA-I antigen on LBC cells and bone-marrow cellularity.



рецепторами для антигенных пептидов Т-хелперов. Утрата этих антигенов выявлена в 63,1% (36/57) случаев ЛРМЖ. HLA-DR антиген экспрессировался большинством опухолевых клеток, или имела его слабая экспрессия частью клеток исследуемого образца в 36,9% (21/57) наблюдений. Как видим, частота экспрессии HLA-DR сходна с таковой при HLA-I.

Изучение Erb-B2 сверхэкспрессирующего РМЖ установило, что в 100% случаев наблюдается утрата молекул главного комплекса гистосовместимости HLA II класса, тогда как экспрессия антигена HLA I класса сохранялась.

При трижды негативном РМЖ экспрессия молекул HLA-I наблюдалась в 70% (7/10) исследуемых образцов опухоли. Отсутствовал антиген HLA-I или экспрессировался единичными опухолевыми клетками в 30% (3/10) случаев. Утрата антигена HLA-DR наблюдалась в 70,0% (7/10), а сохранная экспрессия отмечена в 30% (3/10), что сопоставимо с данными, полученными при ЛРМЖ.

По данным литературы, пропорция антигенпозитивных клеток в отношении экспрессии молекул HLA-I, HLA-DR наблюдается в небольшом проценте случаев, чаще РМЖ характеризуется утратой молекул главного комплекса гистосовместимости как HLA I, так и II класса [14, 15]. Результаты нашей работы согласуются с литературными данными. Изученные молекулярные подтипы РМЖ характеризуются снижением экспрессии данных антигенов. Однако справедливо отметить, что в отношении молекул HLA-I наблюдается более высокая частота их экспрессии при Erb-B2 сверхэкспрессирующем и трижды негативном РМЖ, хотя статистически различия недостоверны. Сохранение экспрессии HLA, как полагают некоторые авторы, может быть связано с ранними стадиями рака, которые, надо отметить, преобладали в нашей выборке [14]. С другой стороны, такое различие может быть характерным признаком отдельного подтипа РМЖ. В своем исследовании В. Sinn и соавт. изучили частоту экспрессии антигенов HLA I класса при нескольких подтипах РМЖ: Pg-/HER2-, Pg+/HER2-, Pg-/HER2+, Pg+/HER2+ [15]. Авторы обратили внимание, что при трижды негативном подтипе, который, как известно, отличается агрессивным течением, частота экспрессии составила 81%, что по сравнению с другими подтипами значительно выше. Принимая это во внимание и учитывая полученные результаты в нашей работе, полагаем, необходимо продолжить набор больных для проведения дальнейших исследований.

Таблица 1. Экспрессия HLA-I, HLA-DR при различных молекулярных подтипах РМЖ
Table 1. Expression of HLA-I, HLA-DR in case of different molecular subtypes of BC

Экспрессия антигена	Молекулярный подтип РМЖ					
	ЛРМЖ		Erb-B2		ТНРМЖ	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
HLA-I «-»	31	50,8	0	0	3	30,0
HLA-I «+»	30	49,2	2	100	7	70,0
HLA-DR «-»	36	63,1	3	100	7	70,0
HLA-DR «+»	21	36,9	-	-	3	30,0

Примечание. ЛРМЖ – ЛРМЖ А и В подтипов, ТНРМЖ – трижды негативный РМЖ; $p>0,05$.

Таблица 2. Экспрессия CD71 при различных молекулярных подтипах РМЖ
Table 2. Expression of CD71 in case of different molecular BC subtypes

Экспрессия антигена	Молекулярный подтип РМЖ					
	ЛРМЖ		Erb-B2		ТНРМЖ	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
CD-71, $p>0,05$						
Нет/единичные опухолевые клетки	19	32,2	2	66,7	3	30,0
Часть клеток/все клетки	40	67,8	1	33,3	7	70,0
Всего	59	100	3	100	10	100

Таблица 3. Сравнение экспрессии HLA-I, HLA-DR при люминальных А и В подтипах
Table 3. The comparison between the expression HLA-I and HLA-DR in luminal A and B subtypes

Экспрессия антигена	А		B-HER2-		B-HER2+	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
HLA-I «-»	12	54,5	18	51,4	1	25,0
HLA-I «+»	10	45,5	17	48,6	3	75,0
HLA-DR «-»	14	70,0	19	55,9	3	100,0
HLA-DR «+»	6	30,0	15	44,1	-	-

$p>0,05$

Таблица 4. Экспрессия CD-71 при люминальных А и В подтипах
Table 4. CD71 expression in luminal A and B subtypes

Экспрессия антигена	А		B-HER2-		B-HER2+	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Нет/единичные опухолевые клетки	10	47,6	8	23,5	1	25,0
Часть клеток/все клетки	11	52,4	26	76,5	3	75,0
Всего	21	100	34	100	4	100

При изучении уровня экспрессии трансферринового рецептора CD71 выявлено, что 67,8% (40/59) исследуемых образцов ЛРМЖ характеризовались выраженной экспрессией данного антигена либо слабой экспрессией всеми опухолевыми клетками образца. Утрата экспрессии трансферрина на опухолевых клетках, или антигеннегативное большинство клеток, или экспрессия данного антигена малым количеством клеток образца установлены в 32,2% (19/59) наблюдений данного подтипа РМЖ.

При Erb-B2 сверхэкспрессирующем РМЖ экспрессия рецептора трансферрина отмечена в 33,3% (1/3) наблюдений, тогда как в 66,6% (2/3) случаев на поверхности опухолевых клеток молекула CD71 отсутствовала или экспрессировалась малым количеством клеток. Как видим, при данном молекулярном подтипе клетки опухоли преимущественно характеризуются отсутствием рецепторов трансферрина. Хотя малое число наблюдений не позволяет предполагать, что это может быть отличительной характеристикой Erb-B2 сверхэкспрессирующего подтипа.

При исследовании трижды негативного подтипа РМЖ установлено, что трансферриновые рецепторы экспрессировались

на поверхности большинства опухолевых клеток в 70% (7/10) анализируемых образцов, а их отсутствие выявлено в 30% (3/10) наблюдений.

Данные сравнения экспрессии молекул CD71 всех трех групп молекулярных подтипов РМЖ представлены в табл. 2.

Известно, что мембранный гликопротеид CD71, обеспечивающий транспорт молекул железа через клеточную мембрану, играет важную роль в пролиферации опухолевых клеток. Сообщается, что в CD71-негативных случаях РМЖ метастазы в регионарные лимфоузлы наблюдаются значительно реже [16]. Экспрессия большого количества трансферриновых рецепторов на поверхности опухолевых клеток коррелирует с их пролиферативной активностью и рассматривается при большинстве злокачественных опухолей как фактор неблагоприятного прогноза. Показано, что прогностическое влияние CD71 проявляется через год с момента хирургического вмешательства, отмечается ухудшение показателей общей и безрецидивной выживаемости как N0, так и N+ больных РМЖ [16]. Принимая во внимание изложенные факты, отметим, что выраженная экспрессия трансферринового рецептора при трижды негативном РМЖ подчеркивает агрессивность данного подтипа. Полагаем, это является основанием для продолжения исследований, в которых возможно было бы целесообразно провести количественную характеристику экспрессии рецептора CD71, а также изучить возможные варианты экспрессии в пределах трижды негативного подтипа, интересным представляется оценить сочетание уровня K167 и уровня TILs с выраженностью экспрессии CD71. Нельзя исключить, что такое детальное изучение профиля CD71 при выявлении существенных различий могло бы позволить индивидуализировать подходы в выборе доз, препаратов неoadъювантной химиотерапии с целью достижения полного патоморфологического ответа и одновременного снижения токсичности. Как известно, даже при достижении полного патоморфологического ответа зачастую у пациенток развивается рецидив и реализуется неблагоприятный прогноз. Это требует более углубленной стратификации больных и модификации режимов лекарственной терапии.

Таким образом, проведенный нами анализ иммунофенотипа опухолевых клеток установил отсутствие статистически значимых различий между изученными молекулярными подтипами РМЖ.

Далее нами изучена экспрессия молекул гистосовместимости HLA-I, HLA-DR в пределах люминальных подтипов РМЖ (табл. 3). Оказалось, что частота утраты антигенов HLA-I опухолевыми клетками при люминальных А и В подтипах не различалась и составила 54,5, 51,4 и 25% соответственно. Отсутствие на мембране HLA-DR антигенов чаще наблюдалось (в 100% случаев) при люминальном B-HER2+ подтипе, тогда как при люминальном А РМЖ – в 70%, однако данные недостоверны.

Изучение экспрессии трансферринового рецептора (CD71) аналогично не установило достоверных различий между люминальными подтипами РМЖ. При этом все же следует отметить, что при люминальных B-подтипах экспрессия трансферринового рецептора опухолевыми клетками наблюдалась гораздо чаще: 76,5 (n=26) и 75% (n=3) против 52,4% (n=11) хотя, как уже отмечено, статистически значимых различий не достигнуто (табл. 4).

Интересные результаты исследования получены при изучении показателей миелограмм больных ЛРМЖ. Установлено, что иммунофенотип опухоли ассоциирован с показателями гемопоза, а именно обнаружена взаимосвязь экспрессии молекулы главного комплекса гистосовместимости HLA-I с эритропоэзом и клеточностью костного мозга. Эта связь заключалась в том, что HLA-I экспрессирующие опухоли люминального рака характеризовались более высокими уровнями эритроидных предшественников и повышенным содержанием миелокариоцитов. Так, при HLA-I позитивных опухолях клеточность костного мозга составила 93,1±17,1 тыс/мкл, тогда как при отсутствии антигенов HLA-I на мембране опухолевых клеток всего 57,3±9,0 тыс/мкл. Следует отметить, что сниженное содержание миелокариоцитов костного мозга наблюдалось чаще в случаях, когда экспрессия HLA-I установлена лишь на единичных клетках или вовсе отсутствовала (рис. 2).

В отношении клеток эритроидного ростка получены следующие данные: средние значения полихроматофильных нормобластов при HLA-экспрессирующих опухолях составили 9,0±0,9% против 5,8±0,8% ($p=0,017$); оксифильных нормобластов –

Таблица 5. Средние значения показателей миелограмм больных ЛРМЖ в зависимости от уровня экспрессии антигена HLA-I
Table 5. The mean values of myelogram parameters in patients with LBC, depending on the expression level of HLA-I antigen

	Экспрессия HLA-I	n	Среднее (M)	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка среднего (m)	p
Базофильные нормобласты, %	Нет	17	0,49	0,47	0,11	0,274
	Да	18	0,68	0,55	0,13	
Полихромафильные нормобласты, %	Нет	17	5,8	3,615	0,87	0,017
	Да	18	9,02	3,96	0,93	
Оксифильные нормобласты, %	Нет	17	5,32	2,50	0,60	0,008
	Да	18	7,98	2,99	0,70	
Сумма клеток эритроидного роста, %	Нет	17	11,62	6,27	1,52	0,009
	Да	18	17,70	6,56	1,54	
Лейкоэритробластическое соотношение	Нет	17	9,56	9,94	2,41	0,020
	Да	18	3,72	1,85	0,43	
Клеточность, тыс./мкл	Нет	16	57,31	36,01	9,00	0,083
	Да	18	93,16	72,64	17,12	

Примечание. «Нет» – отсутствие экспрессии/единичные опухолевые клетки, «да» – антиген экспрессируется частью клеток/все клетки.

7,9±0,7% против 5,3±0,6% (p=0,008). Наравне с этим суммарное содержание клеток эритроидного роста также достоверно выше (17,7±1,5% и 11,6±1,5%, p=0,009). Это нашло отражение в изменении лейко-эритробластического соотношения, которое составило 3,7±0,4 против 9,5±2,4 при HLA-I-негативных опухолях (p=0,02). Аналогичной связи с уровнем экспрессии молекул HLA-DR не отмечено (табл. 5). Таким образом, в ходе анализа выявлены определенные изменения гемопоэза у больных HLA-I-негативным ЛРМЖ, что, безусловно, заслуживает внимания и должно стать предметом дальнейших исследований.

Заключение

В данном исследовании выполнена оценка экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA-I, HLA-DR) и трансферринового рецептора (CD71) на мембране клеток при различных молекулярных подтипах РМЖ. Снижение уровней экспрессии молекул HLA I класса сочеталось с отсутствием на мембране опухолевых клеток антигенов HLA-DR, что наблюдалось в более чем 1/2 анализируемых образцов. Частота экспрессии при трижды негативном раке выше, чем при люминальном подтипе. Статистически значимых различий между молекулярными подтипами в уровне экспрессии молекул HLA I

и II класса не выявлено. Экспрессия трансферринового рецептора выявлена в большинстве случаев трижды негативного подтипа РМЖ, что, по-видимому, отражает его более агрессивное течение. Установлена связь экспрессии молекул гистосовместимости HLA-I с показателями гемопоэза при ЛРМЖ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Вклад авторов. Д.А. Рябчиков, С.В. Чулкова, Н.Н. Тупицын: дизайн исследования, написание текста рукописи, анализ данных, перевод; Ф.А. Шамилов, С.Д. Желтиков, Н.В. Чантуря: перевод, оформление рукописи.

Authors' contributions. D.A. Ryabchikov, S.V. Chulkova, N.N. Tupitsyn: research design, writing manuscript text, data analysis; F.A. Shamilov, S.D. Zheltikov, N.V. Chanturia: translation, manuscript preparation.

Литература/References

- American Cancer Society. Cancer Fact and Figures. 2020. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2020.html>
- Коваленко Е.М., Артамонова Е.В. Неoadъювантная терапия рака молочной железы. Значение резидуальной болезни. *Мед. алфавит.* 2020;20:30-3 [Kovalenko EI, Artamonova EV. Neoadjuvantnaia terapiia raka molochnoi zhelezy. Znachenie rezidual'noi bolezni. *Med. alfavit.* 2020;20:30-3 (in Russian)].
- Sabbatino F, Liguori L, Polcaro G, et al. Role of Human Leukocyte Antigen System as A Predictive Biomarker for Checkpoint-Based Immunotherapy in Cancer Patients. *Int J Mol Sci.* 2020;21:7295.
- da Silva GB, Silva TG, Duarte RA, et al. Expression of the Classical and Nonclassical HLA Molecules in Breast Cancer. *Int J Breast Cancer.* 2013;2013:250435.
- Shukla A, Cloutier M, Santharam AM, et al. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1964. DOI:10.3390/ijms22041964; PMID: 33671123
- Pedersen MH, Hood BL, Beck HC, et al. Downregulation of antigen presentation-associated pathway proteins is linked to poor outcome in triple-negative breast cancer patient tumors. *Oncoimmunology.* 2017;6(5):e1305531. DOI:10.1080/2162402X.2017.1305531
- Nabashy HO, Powe DG, Staka CM, et al. Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119:283.
- Беришвили А.И., Тупицын Н.Н., Лактионов К.П. Иммунофенотипическая характеристика отечно-инфильтративной формы рака молочной железы. *Опухоли женской репродуктивной системы.* 2009;3-4:15-9 [Berishvili AI, Tupitsyn NN, Laktionov KP. Immunofenotipicheskaia kharakteristika otechno-infil'trativnoi formy raka molochnoi zhelezy. *Opukholi zhenskoi reproduktivnoi sistemy.* 2009;3-4:15-9 (in Russian)].
- Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования в диагностике и прогнозе рака молочной железы. *Иммунология гемопоэза.* 2009; 1(9):8-52 [Artamonova EV. Rol' immunofenotipirovaniia v diagnostike i prognoze raka molochnoi zhelezy. *Immunologiya gemopoéza.* 2009; 1(9):8-52 (in Russian)].
- Чулкова С.В., Кожоналиева А.М., Стилиди И.С., и др. Характеристика эритроидного роста костного мозга у больных раком яичников. *Мед. алфавит.* 2021;1:39-45 [Chulkova SV, Kozhonalieva AM, Stilidi IS, et al. Kharakteristika eritroidnogo rosta kostnogo mozga u bol'nykh rakom iaichnikov. *Med. alfavit.* 2021;1:39-45 (in Russian)].
- Чулкова С.В., Тупицын Н.Н., Джуманазаров Т.М., и др. Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у больных немелкоклеточным раком легкого. *Рос. биотерапевт. журн.* 2020;19(3):29-37 [Chulkova SV, Tupitsyn NN, Dzhumanazarov TM, et al. Obnaruzhenie disseminirovannykh opukholyevykh kletok v kostnom mozge u bol'nykh nemelkokletchnym rakom legkogo. *Ros. bioterapevt. zhurn.* 2020;19(3):29-37 (in Russian)].
- Рябчиков Д.А., Безнос О.А., Дудина И.А., и др. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. *Рос. биотерапевт. журн.* 2018;17(1):53-7 [Riabchikov DA, Beznos OA, Dudina IA, et al. Disseminirovannye opukholyevye kletki u patsientov s liuminal'nym rakom molochnoi zhelezy. *Ros. bioterapevt. zhurn.* 2018;17(1):53-7 (in Russian)].
- Kaneko K, Ishigami S, Kijima Y, et al. Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. *BMC Cancer.* 2011;11:454. DOI:10.1186/1471-2407-11-454
- Энгай Д.А., Поддубная И.В., Тупицын Н.Н. Особенности иммунофенотипа клеток рака молочной железы IIb стадии. *Сиб. онкол. журн.* 2007;4(24):66-9 [Engai DA, Poddubnaia IV, Tupitsyn NN. Osobennosti immunofenotipa kletok raka molochnoi zhelezy IIb stadii. *Sib. onkol. zhurn.* 2007;4(24):66-9 (in Russian)].
- Sinn BV, Weber KE, Schmitt WD, et al. Human leucocyte antigen class I in hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer: association with response and survival after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2021;142:2019.
- Chemysheva O, Markina I, Demidov L, et al. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. *Cells.* 2019;8:627. DOI:10.3390/cells8060627; PMID: 31234438

Статья поступила в редакцию / The article received: 29.03.2021
 Статья принята к печати / The article approved for publication: 12.07.2021

