

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ АЛЛОГЕННЫХ ФЕТАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е. В. Бубович¹, В. М. Абунагимов², В. В. Вагина²,
А. А. Ибрагинбекова¹, В. Е. Видуто²

¹ Сургутский государственный университет, Сургут, Россия

² Сургутская окружная клиническая больница, Сургут, Россия

Цель – определить роль аллогенных фетальных клеток в опухолевой ткани молочной железы с различным рецепторным статусом опухолевых клеток. **Материал и методы.** У 36 пациенток с впервые выявленной инвазивной аденокарциномой молочной железы определяли аллогенные фетальные клетки в тканях центральной зоны опухолевой среды методом FISH. **Результаты.** Установлено, что у 72,2 % женщин аллогенные фетальные клетки регистрируются в диапазоне от 1 до 25. Наибольшее статистически значимое ($p \leq 0,05$) количество клеток выявлено при IIB стадии и при подтипе люминальном В+ (гормон-рецептор-позитивный и HER2+). У всех пациенток в центральной зоне опухоли, в области расположения фетальных клеток, была выявлена низкая (менее 10 %) инфильтрация лимфоцитов. Однако наименьший статистически значимый ($p \leq 0,05$) показатель был получен в одном из наиболее неблагоприятных по течению подтипе люминальном В+ HER2+ в группе у женщин с диагностированными фетальными клетками. У этих же пациенток отмечена линейная корреляция между количеством аллогенных клеток и лимфоцитов, что дополнительно указывает на снижение иммунологической активности тканей и прогностически неблагоприятный исход в лечении и ремиссии.

Ключевые слова: аллогенные фетальные клетки, инвазивная аденокарцинома молочной железы.

Шифр специальности: 14.03.03 Патологическая физиология.

Автор для переписки: Бубович Елена Владимировна, e-mail: bubovichev@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы является ведущей онкологической патологией у женского населения в России и в 2018 г. составляет 20,9 % от всех злокачественных

новообразований, возникающих у женщин. Истинные причины развития данного заболевания, как и большинства злокачественных опухолей, не известны.

PATHOLOGICAL ROLE OF ALLOGENIC FETAL CELLS INFILTRATING BREAST TUMOR

E. V. Bubovich¹, V. M. Abunagimov², V. V. Vagina²,
A. A. Ibraginbekova¹, V. E. Viduto²

¹ Surgut State University, Surgut, Russia

² Surgut Regional Clinical Hospital, Surgut, Russia

The study aims to determine the role of the allogenic fetal cells in the breast tumor tissue with various receptor status of tumor cells. **Material and methods.** Allogenic fetal cells in the tissues of the central zone of the tumor environment were determined by the FISH method in 36 patients with newly diagnosed invasive adenocarcinoma of the mammary gland. **Results.** 72.2 % of women were confirmed to have allogenic fetal cells recorded in the range from 1 to 25. The highest statistically significant ($p \leq 0.05$) number of cells was found in IIB stage, with the subtype luminal B+ (hormone receptor positive and HER2+). Low (less than 10 %) lymphocyte infiltration was found in all patients' central zone of the tumor, in the area of the fetal cells. However, the lowest statistically significant ($p \leq 0.05$) indicator was obtained in one of the most adverse course subtype luminal B+ HER2+, in the group of women with diagnosed fetal cells. A linear correlation was noted between the number of allogenic cells and lymphocytes in the same patients, which additionally indicates a decrease in the immunological activity of tissues and a prognostic adverse outcome in treatment and remission.

Keywords: allogenic fetal cells, invasive mammary gland adenocarcinoma.

Code: 14.03.03 Pathophysiology.

Corresponding Author: Elena V. Bubovich, e-mail: bubovichev@gmail.com

На сегодняшний день фактором риска развития данного заболевания признан в 5–10 % семейный анамнез; в 7–10 % случаев у пациенток с раком молочной железы диагностируются генные мутации BRCA1, BRCA2, p53, CDH1. До 50 % пациенток не имеют значимых факторов развития рака молочной железы [1].

Данными научной литературы подтверждено, что во время беременности имеет место проникновение клеток плода через плацентарный барьер в материнский кровоток. Некоторые фетальные популяции клеток сохраняются в кровообращении и тканях матерей длительное время без какой-либо видимой аутоиммунной реакции. Современные исследования указывают на связь фетальных аллогенных клеток с различными подтипами рака молочной железы, а также на то, что количество этих клеток в тканях молочной железы ассоциируется с эстроген/прогестерон позитивным раком молочной железы [2–3].

В одних исследованиях наличие аллогенных клеток в материнском организме связывают в 90 % случаев с аденокарциномой молочной железы, другие исследования указывают на их адаптивные и компенсаторные возможности [3–4].

В связи с этим изучение роли аллогенных фетальных клеток в опухолевой среде молочной железы, способных в организме женщины проявлять иммунологическую компетентность, дифференцироваться в различные виды клетки, обладать саморегуляцией, взаимодействовать с рецепторами других клеток, а также влиять на течение и исход опухолевого процесса, является в настоящее время фундаментальным и клинически значимым.

Цель – определить роль аллогенных фетальных клеток в опухолевой ткани молочной железы с различным рецепторным статусом опухолевых клеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведение исследования одобрено этическим комитетом Сургутского государственного университета, согласовано с администрацией Сургутской окружной клинической больницы. В проспективном исследовании приняли участие 36 женщин, находившихся на оперативном лечении в онкологическом отделении маммологического профиля. Все женщины имели диагноз «впервые возникшая инвазивная карцинома молочной железы, подтвержденная результатами биопсии». Возраст пациенток был в диапазоне от 38 до 72 лет. У всех пациенток определялись факторы риска развития рака молочной железы, при этом значимых факторов выявлено не было. Для чистоты проведения исследования были определены следующие критерии включения пациенток в исследование: впервые выставленный диагноз «аденокарцинома», отсутствие трансфузий донорской крови, отсутствие в анамнезе химиотерапии, наличие детей мужского пола. Все пациентки после оперативного лечения продолжали получать противоопухолевую терапию. В исследование были включены только те пациентки, которые дали добровольное информированное согласие на его проведение.

С целью диагностики рака молочной железы использовали генетические, гистологические, иммуногистохимические, морфометрические методы исследования по стандартным методикам. В биопсионном интраоперационном материале оценивали подтип опухоли, стадию, наличие метастаз в лимфатических

узлах, уровень экспрессии рецепторов ER/PR; Ki67, HER2, амплификацию гена HER2 по стандартным методикам.

Для понимания роли аллогенных фетальных клеток в опухолевой среде определяли их наличие и количество в биоптате ткани молочной железы методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Парафиновые срезы толщиной 5 мкм изготавливали из центрального участка опухолевой ткани молочной железы. Количество фетальных клеток в срезах тканей определяли путем подсчета тех ядер, которые имели два разных флуоресцентных сигнала, представляющих X- и Y-хромосомы. Подсчет ядер, содержащих X- и Y-хромосомы, проводился в 300–500 полях зрения на каждом стекле. Контролем для выявления фетальных клеток являлся биопсионный материал молочной железы, взятый от мужчины. Иммунологическую активность опухоли оценивали путем подсчета инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), находящихся в пределах инвазивной опухоли. Срез готовили из одного участка блока, взятого для всех видов исследования. Подсчету подлежали только лимфоциты и плазматические клетки, не учитывались полиморфно-ядерные лейкоциты, макрофаги и дендритные клетки. Для оценки использовали 3 категории инфильтрации лимфоцитами: низкую (0–10 %), промежуточную (11–59 %) и высокую (60–100 %).

Статистический анализ данных проводился согласно общепринятым методам с использованием лицензионной программы «StatSoft Statistics Base 12». Количественные показатели, не соответствующие закону нормального распределения, оценивались с помощью непараметрического критерия медиан (Me), нижнего и верхнего квартилей [Q1; Q3]. Для сравнения средних величин двух групп применяли метод Манна – Уитни, трех групп – метод Краскела – Уоллиса. Для оценки взаимосвязи между показателями определялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считались установленные закономерности при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенных исследований все пациентки разделились на две группы. Группу I составили 26 (72,2 %) пациенток, у которых были выявлены аллогенные фетальные клетки в центральной зоне опухолевой среды, их количество варьировалось в диапазоне от 1 до 25 и в среднем составило 8 [6,0; 10,75] клеток (рис. 1). В группе II у 10 (27,7 %) женщин аллогенные клетки не выявлены.

При определении стадии рака молочной железы и наличия аллогенных фетальных клеток были получены следующие данные. В группе I у 11 (42,2 %) пациенток была диагностирована аденокарцинома IA, В стадии (T1N0M0, T1N1M0), количество фетальных клеток варьировалось от 2 до 12 и в среднем составило 6,0 [4,5; 8,0] клеток. У 15 (57,8 %) пациенток определена IIA, В стадия (T2N0M0, T2N1M0), при этом насчитывалось от 2 до 25 (10,0 [6,0; 13,5]) клеток. Распределение пациенток по стадиям рака представлено в табл. 1.

При анализе количества аллогенных клеток при I и II стадиях рака молочной железы выявлено, что их количество статистически значимо ($p \leq 0,05$) возрастает вместе с прогрессированием стадии рака и появле-

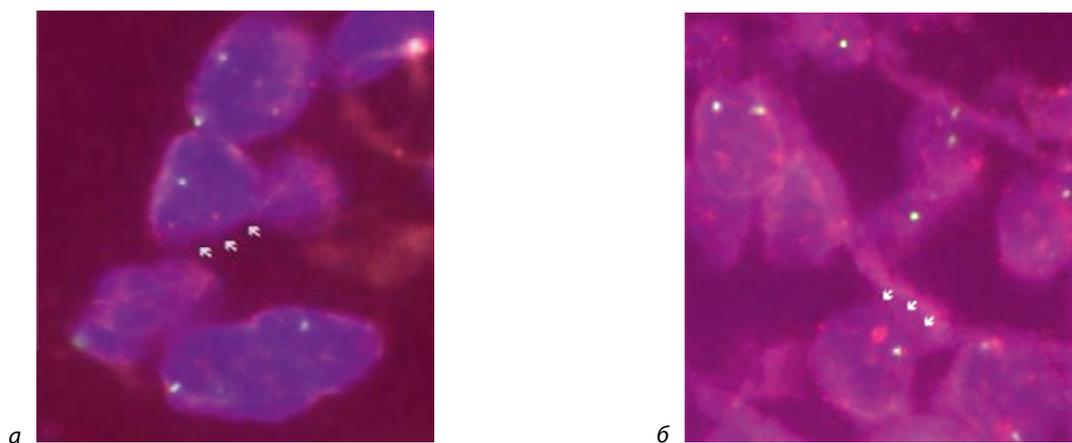


Рис. 1. Аллогенная фетальная клетка, содержащая ядро с двумя разными флуоресцентными сигналами, представляющими X- и Y-хромосомы (а, б)

Таблица 1

Наличие фетальных клеток в опухолевой среде у пациенток I группы в зависимости от стадии рака (n = 26)

Стадия	IA, B (n = 11)	IIA, B (n = 15)	p метод Манна – Уитни
Количество аллогенных клеток	6,0 [4,5; 8,0]	10,0 [6,0; 13,5]	< 0,05

нием метастазов. Эти данные могут свидетельствовать о том, что опухолевый процесс формируется в местах исходного скопления фетальных клеток, либо о том, что данные клетки активно начинают рекрутироваться в очаге канцерогенеза.

В группе II у женщин без фетальных клеток в 90 % случаев выявлена I стадия и в 10 % – IIA, что указывает на более благоприятное состояние и течение заболевания в данной группе.

С целью изучения аллогенных клеток в опухолевой среде как маркеров прогноза рецидива и метастазирования все пациентки были разделены на подгруппы в соответствии с классификацией по молекулярно-биологическим подтипам рака молочной железы.

В группе I люминальный A (ER +, HER-2-, Ki-67 < 10 %) подтип был выявлен у большинства пациенток – 14 (53,8 %), у которых насчитывалось от 2 до 8 аллогенных клеток (в среднем 6,5 [3,5; 8,0]). С люминальным B, HER-2 отрицательным подтипом (ER+, HER-2-, Ki-67 > 20 %) зарегистрированы 8 (30,7 %) пациентов, коли-

чество клеток варьировалось от 6 до 4 (в среднем 9,0 [5,75; 10,5]). Люминальный B, HER-2 положительный (ER+, HER-2+, Ki-67 > 20%) подтип определен у 4 (11,1 %) женщин, количество клеток – от 6 до 25 (в среднем 15,5 [7,5; 23,5]), что статистически значимо выше (p ≤ 0,05) в сравнении с показателями предыдущих двух подтипов. Пациенток с HER-2 гиперэкспрессированным (ER-, HER-2+, Ki-67 – любой) и тройным негативным подтипом рака (ER-, HER-2-, Ki-67 – любой) выявлено не было.

Анализируя количество аллогенных клеток, выявленных при различных подтипах рака молочной железы, необходимо отметить, что с прогрессированием тяжести неопластического процесса количество аллогенных клеток статически значимо увеличивается (p ≤ 0,05). Наибольшее количество клеток было выявлено при подтипе люминальном B – гормон-рецептор-положительный и HER-2+, который характеризуется достаточно высокой пролиферацией и значительным риском развития рецидива заболевания (табл. 2).

Таблица 2

Распределение аллогенных клеток в зависимости от молекулярно-биологического подтипа рака молочной железы у пациенток группы I

Подтипы	Люминальный A n = 14 (1)	Люминальный B- (HER-2-) n = 8 (2)	Люминальный B+ (HER-2+) n = 4 (3)	p метод Манна – Уитни		
				1-2	2-3	1-3
Количество аллогенных фетальных клеток	6,5 [3,5; 8,0]	9,0 [5,75; 10,5]	15,5 [7,5; 23,5]	< 0,05	> 0,05	< 0,05

В процессе анализа группы II пациенток без микрохимерных клеток у 9 (81,8 %) пациенток был выявлен только подтип люминальный А и у 1 пациентки (18,2 %) – подтип люминальный В, HER-2 отрицательный, что говорит о более благоприятном течении опухолевого процесса у женщин без наличия аллогенных фетальных клеток.

По мнению ряда авторов, длительное присутствие аллогенных клеток в материнском организме без какой-либо иммунологической реакции по типу «трансплантат против хозяина» указывает на то, что они относятся к мультипатентной стволовой клетке. Проходя дифференцировку в организме матери, они участвуют в патологических процессах, в том числе и неопластических: в развитии меланомы, рака щитовидной железы, легких, шейки матки, молочной железы и колоректального рака [2–4].

Так, у пациенток группы I длительность периода от последней беременности до выявления аллоген-

ных фетальных клеток составила $18,8 \pm 1,5$ года, что непосредственно указывает на низкую дифференцировку данных клеток и возможную их иммунологическую природу. Для выявления анти- или опухолевой роли данных клеток в микроокружении был проведен анализ количества лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль в зоне выявленных аллогенных фетальных клеток.

Так, иммунологическая активность лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у пациенток группы I была низкой и составила менее 10 % (диапазон от 0 до 10 %), что характерно для типичного опухолевого процесса.

При оценке лимфоцитов в зависимости от подтипа рака были определены следующие значения: при люминальном А подтипе активность составила 3,0 [2,0; 3,75], при люминальном В- – 4,0 [3,0; 5,25], при люминальном В+ – 3,0 [2,25; 3,25]. При этом статически значимых межгрупповых различий не выявлено (табл. 3).

Таблица 3

Распределение лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль в зависимости от молекулярно-биологического подтипа у женщин группы I

Подтип рака	Люминальный А (n = 14)	Люминальный В- (HER-2-) (n = 8)	Люминальный В+ (HER-2+) (n = 4)	p метод Краскела – Уоллиса
Количество лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль	3,0 [2,0; 3,75]	4,0 [3,0; 5,25]	3,0 [2,25; 3,25]	> 0,05

Последние данные рандомизированных клинических исследований, оценивающих лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, указывали на важность иммунитета, особенно при неблагоприятном подтипе HER-2+ и тройном негативном, а также на тот факт, что чем выше количество лимфоцитов на момент исследования, тем лучше прогноз в исходе адъювантной терапии у данных пациентов [6–8]. Однако у наших пациентов с фетальными клетками исходное количество лимфоцитов достаточно низкое, что в принципе характерно для неопластического процесса рака молочной железы. Возможно, это может указывать на иммуносупрессивное действие фетальных клеток на клеточное микроокружение в области опухолевого процесса.

Учитывая наличие признаков, указывающих на иммуносупрессивную и/или опухолевую активность аллогенных фетальных клеток, был проведен корреляционный анализ по выявлению взаимосвязи между количеством лимфоцитов и аллогенных клеток в опухолевой среде.

Методом ранговой корреляции установлена прямая средней силы связь между показателями количества аллогенных клеток и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль: $r = 0,49$, $p = 0,01$.

Так, низкая или отсутствующая инфильтрация лимфоцитов в совокупности с возрастающей концентрацией аллогенных клеток при прогрессировании рака указывает на неспособность иммунологической системы контролировать неопластический процесс, что, возможно, в дальнейшем проявится низкой восприимчивостью к иммунотерапии и быстрому рецидиву.

Это указывает на патологическую роль, принадлежащую аллогенным фетальным клеткам.

В группе II анализ концентрации лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, как и в группе I, показал их низкое значение (менее 10 %) и составил 3,0 [1,0; 5,0], при этом статические различия не выявлены в сравнении с показателями пациенток группы I с раком молочной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют нам говорить о том, что у женщин с раком молочной железы при отсутствии аллогенных фетальных клеток имеется более благоприятный прогноз течения заболевания, лечения и выживаемости. У 90 % пациенток гистологически диагностирована IA стадия, не выявлен агрессивный подтип HER2+, нет результатов с высокой пролиферативной активностью (Ki-67), поэтому ожидается благоприятный исход лечения и прогноз по выживаемости.

У пациенток с наличием аллогенных фетальных клеток выявлено в большинстве случаев более тяжелое течение опухолевого процесса. Так, у 57,8 % имеется IIA, B стадия, у 11,1 % определен агрессивный подтип HER2+. Установлено, что фетальные клетки в организме женщины персистируют более 18 лет, у пациенток с наибольшим количеством аллогенных клеток выявлено более неблагоприятное и агрессивное течение неопластического процесса, что указывает на патогенную (канцерогенную) роль аллогенных фетальных клеток и высокую их устойчивость к иммунным механизмам организма. Это, в свою очередь,

позволяет прогнозировать неблагоприятный исход в лечении и выживаемости.

Можно сказать, что аллогенные фетальные клетки имеют мультипатентное гетерогенное происхождение и способны повышать опухолевую активность в тканях молочной железы через эпигенетические или генетические механизмы.

Таким образом, роль аллогенных фетальных клеток в развитии неопластического процесса молочной железы требует дальнейших фундаментальных исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апанасевич В. И., Артамонова Е. В., Бесова Н. С., Божок А. А., Бусько Е. А. и др. «Золотой стандарт 2020» диагностики и лечения рака молочной железы. М.: ИД АБВ-пресс, 2020. 173 с.
2. Dhimolea E., Denes V., Lakk M. et al. High male chimerism in the female breast shows quantitative links with cancer // *Int J Cancer*. 2013. Vol. 133, Is. 4. P. 835–842.
3. Nemescu D., Ursu R. G., Nemescu E. R. Heterogeneous distribution of fetal microchimerism in local breast cancer environment // *PLoS One*. 2016. Vol. 11. DOI 10.1371/journal.pone.0147675.
4. Gadi V. K., Nelson J. L. Fetal microchimerism in women with breast cancer // *Cancer Res*. 2007. Vol. 67. P. 9035–9038.
5. Гришина К. А., Музаффарова Т. А., Хайленко В. А., Карпукhin А. В. Молекулярно-генетические маркеры рака молочной железы // *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2016. № 12 (3). С. 36–42.
6. Стенина М. Б., Царева Е. В., Жаров А. А., Тюляндин С. А. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты: биологическая суть и клиническое значение при раке молочной железы // *Российский онкологический журнал*. 2016. № 21 (1–2). С. 92–100.
7. Щепотин И. Б., Зотов А. С., Любота Р. В., Аникусько Н. Ф., Любота И. И. Клиническое значение стволовых клеток рака молочной железы // *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2014. № 3. С. 14–19.
8. Колядина И. В., Андреева Ю. Ю., Франк Г. А., Поддубная И. В. Роль биологической гетерогенности при рецидивирующем и метастатическом раке молочной железы // *Архив патологии*. 2018. № 80 (6). С. 62–67. DOI: <https://doi.org/10.17116/patol20188006162>.

REFERENCES

1. Apanasevich V. I., Artamonova E. V., Besova N. S., Bozhok A. A., Busko E. A. et al. "Zolotoi standart 2020" diagnostiki i lecheniia raka molochnoi zhelezy. Moscow : ID ABV-press, 2020. 173 p. (In Russian).
2. Dhimolea E., Denes V., Lakk M. et al. High male chimerism in the female breast shows quantitative links with cancer // *Int J Cancer*. 2013. Vol. 133, Is. 4. P. 835–842.
3. Nemescu D., Ursu R. G., Nemescu E. R. Heterogeneous distribution of fetal microchimerism in local breast cancer environment // *PLoS One*. 2016. Vol. 11. DOI 10.1371/journal.pone.0147675.
4. Gadi V. K., Nelson J. L. Fetal microchimerism in women with breast cancer // *Cancer Res*. 2007. Vol. 67. P. 9035–9038.
5. Grishina K. A., Muzaffarova T. A., Khailenko V. A., Karpukhin A. V. Molecular genetic markers of breast cancer // *Tumors of female reproductive system*. 2016. No. 12 (3). P. 36–42. (In Russian).
6. Stenina M. B., Tsareva E. V., Zharov A. A., Tyulyandin S. A. Tumor infiltrating lymphocytes: bio-logical essence and clinical significance in breast cancer // *Russian Journal of Oncology*. 2016. No. 21 (1–2). P. 92–100. (In Russian).
7. Shchepotin I. B., Zotov A. S., Lyubota R. V., Anikusko N. F., Lyubota I. I. The clinical significance of breast cancer stem cells (review of literature) // *Tumors of female reproductive system*. 2014. No. 3. P. 14–19. (In Russian).
8. Kolyadina I. V., Andreeva Yu. Yu., Frank G. A., Poddubnaya I. V. Role of biological heterogeneity in recurrent and metastatic breast cancer // *Arkhiv Patologii*. 2018. No. 80 (6). P. 62–67. DOI: <https://doi.org/10.17116/patol20188006162>. (In Russian).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бубович Елена Владимировна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей патологии и патофизиологии, Медицинский институт, Сургутский государственный университет, Сургут, Россия.

SPIN: 5577-5585.

E-mail: bubovichev@gmail.com

Абунагимов Виталий Маратович – заведующий онкологическим отделением маммологического профиля, Сургутская окружная клиническая больница, Сургут, Россия.

E-mail: avm777@my.com

Вагина Виктория Викторовна – врач-генетик, Клинико-диагностическая лаборатория, Сургутская окружная клиническая больница, Сургут, Россия.

E-mail: bubovichev@gmail.com

Ибрагинбекова Анжелика Ахмедовна – студент, Медицинский институт, Сургутский государственный университет, Сургут, Россия.

E-mail: ibraginbekowa@yandex.ru

Видуто Валентина Евгеньевна – врач-патологоанатом, патологоанатомическое отделение, Сургутская окружная клиническая больница, Сургут, Россия.

E-mail: ikar-malikova@ya.ru

ABOUT THE AUTHORS

Elena V. Bubovich – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor, Department of General Pathology and Pathophysiology, Medical Institute, Surgut State University, Surgut, Russia.

SPIN: 5577-5585.

E-mail: bubovichev@gmail.com

Vitaly M. Abunagimov – Head, Oncology Department of Mammology, Surgut Regional Clinical Hospital, Surgut, Russia.

E-mail: avm777@my.com

Viktoriya V. Vagina – Geneticist, Clinical and Diagnostic Laboratory, Surgut Regional Clinical Hospital, Surgut, Russia.

E-mail: bubovichev@gmail.com

Anzhelika A. Ibraginbekova – Student, Medical Institute, Surgut State University, Surgut, Russia.

E-mail: ibraginbekowa@yandex.ru

Valentina E. Viduto – Pathologist, Department of Morbid Anatomy, Surgut Regional Clinical Hospital, Surgut, Russia.

E-mail: ikar-malikova@ya.ru