

MEDICAL SCIENCES

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КЛЕТОК ОПУХОЛЕВОЙ ПАРЕНХИМЫ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЕГО СВЯЗЬ С ВОЗМОЖНОСТЬЮ РЕЦИДИВА ОПУХОЛИ

Бросалов В.М.

Ассистент, Пензенский государственный университет

PHENOTYPICAL DIVERSITY OF TUMOR PARENCHYMA CELLS IN BREAST CANCER AND ITS RELATIONSHIP WITH THE POSSIBILITY OF TUMOR RECURRENCE

Brosalov V.

Assistant, Penza State University

Аннотация

Рак молочной железы остается самой распространенной опухолью среди женского населения. Несмотря на снижение смертности от данного заболевания в результате разработки эффективных алгоритмов лечения, за счет широкой распространенности данной опухоли количество человек, страдающих от прогрессии данного заболевания, остается значительным. Это определяет актуальность разработки новых прогностических моделей с целью более точной оценки вероятности прогрессии. Выделены основные фенотипы клеток опухолевой паренхимы, которые встречаются в любых гистологических типах рака молочной железы. Биоразнообразие опухолей, продемонстрировавших склонность к рецидивированию в течение 3-летнего наблюдения, выше, чем у опухолей, не рецидивировавших за время наблюдения. После начала неoadъювантной химиотерапии степень биологического разнообразия разных типов опухолей усредняется.

Abstract

Breast cancer remains the most common tumor in the female population. Despite the decrease in mortality from this disease as a result of the development of effective treatment algorithms, due to the wide prevalence of this tumor, the number of people suffering from the progression of this disease remains significant. This determines the relevance of the development of new predictive models in order to more accurately assess the likelihood of progression. The main phenotypes of tumor parenchyma cells, which are found in any histological types of breast cancer, have been identified. The biodiversity of tumors that showed a tendency to recurrence during the 3-year follow-up is higher than in tumors that did not recur during the observation period. After the initiation of neoadjuvant chemotherapy, the degree of biological diversity of different types of tumors is averaged out.

Ключевые слова: внутриопухолевая гетерогенность, рак молочной железы.

Keywords: intra-tumor heterogeneity, breast cancer.

В 2020 году во всем мире у 2,3 миллиона женщин был диагностирован рак молочной железы (РМЖ), при этом 685 000 человек умерли в результате причин, связанных с данным заболеванием. В конце 2020 года в мире насчитывалось 7,8 миллиона женщин, у которых в течение последних 5 лет был диагностирован РМЖ. Это позволяет считать его самой распространенной злокачественной опухолью в мире, вносящей значительный вклад в заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний [1]. РМЖ представляет собой неоднородное заболевание, состоящее из нескольких гистологических типов опухолей, прогноз для которых значительно варьирует. У пациентов с РМЖ 5-летняя безрецидивная выживаемость колеблется от 65 до 80%, а 10-летняя общая выживаемость колеблется от 55 до 96% [2]. Подобные проценты выживаемости могут говорить о достаточной эффективности используемых алгоритмов лечения, однако за счет широкой распространенности данной опухоли количество человек, страдающих от прогрессии данного заболевания, остается значительным, что объясняет актуальность данного исследования.

Важность прогнозирования РМЖ обуславливается социальной значимостью заболевания. Чем

точнее прогнозируется исход РМЖ, тем более корректное лечение возможно назначить пациенту, избежав слишком агрессивного режима терапии (снижающего качество жизни пациента) или, наоборот, назначить более агрессивное лечение, в случаях, когда прогноз исхода заболевания неблагоприятный [3, 4].

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 125 пациенток с первичной местно-распространенной формой РМЖ (стадии IIIA кроме T3N1M0, IIIB, IIIC) с люминальным А типом (61,6 %, n = 77), люминальным В HER2 отрицательным типом (10,4 %, n = 13), люминальным В HER2 положительным типом (10,4 %, n = 13), HER2 положительным не люминальным типом (8 %, n = 10) и тройным отрицательным типом (9,6 %, n = 12). Исследование проводилось в 3 этапа соответственно тактике терапии, при этом на третьем этапе пациентки были разделены на 2 группы: 1 – без рецидива в течение 3 лет, 2 – с любым рецидивом опухоли в течение 3 лет наблюдения.

Наиболее простой способ фенотипирования опухолевых клеток заключается в морфометрии (линейные размеры и объемы клетки и ядра,

ядерно-цитоплазматическое соотношение) с учетом неметрических признаков (форма клетки и ядра, окраска, наличие вакуолей и других включений). Именно этот подход был выбран за основу методики. Однако возникла необходимость максимально унифицировать выделяемые фенотипы, оставив только принципиально важные, фенотипообразующие черты и проигнорировав непостоянные признаки. За таковые были приняты наиболее постоянные для каждого отдельного типа опухолевых клеток признаки: размер клеток, степень окрашивания цитоплазмы и ядра, форма клеток и их ориентация (по направлению ядер, форме клетки и положению в эпителиальном пласте – выделены ориентированные клетки, характерные для эпителиальной дифференцировки, и дезориентированные, типичные для эпителиально-мезенхимального перехода).

На каждом этапе исследования для каждой опухоли с целью оценки разнообразия и выравнивания (гетерогенности и доли каждой группы в массе опухоли) рассчитывался индекс Шеннона ти-

пичным способом на основании количества представителей (клеток) каждого выделенного фенотипа [5].

Результаты

Удалось выделить следующие относительно постоянные фенотипы клеток, которые могут быть обнаружены во время исследования любого препарата, окрашенного гематоксилином-эозином, в любой опухоли вне зависимости от паттерна, гистологического типа, стадии или биологического типа опухоли: I тип – полигональные крупные клетки со светлой цитоплазмой и светлым ядром; II тип – полигональные крупные клетки со светлой цитоплазмой и темным ядром; III тип – полигональные вытянутые ориентированные клетки с темной цитоплазмой и темным ядром (эпителиальный фенотип); IV тип – вытянутые и неправильной формы отростчатые дезориентированные клетки с темной цитоплазмой и темным ядром (эпителиально-мезенхимальный переход); V – энтоз (фигуры типа «клетка в клетке»), многоядерные клетки; VI тип – дистрофичные и апоптотические клетки (клетки с признаками кардиолитиза, кариопикноза, апоптосомами) – см. рис. 1.

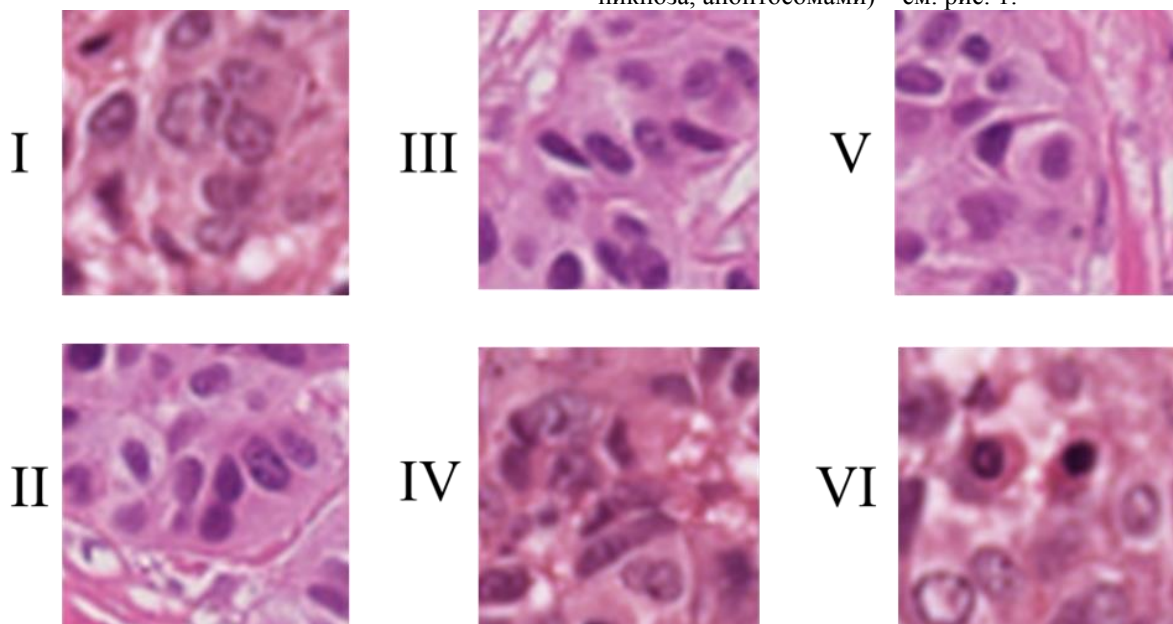


Рисунок 1. Фенотипы клеток опухолевой паренхимы

Аналогичные методы фенотипирования широко используются в клинической практике, однако здесь мы предприняли попытку соотнести классические фенотипы с их патофизиологическими проявлениями – способностью к эпителиально-мезенхимальной трансформации, мезенхимально-амебoidному переходу и соответственно способностью к разным способам инвазии.

Клетки I типа демонстрировали наибольшую митотическую активность (10 ± 4 митозов в 5 полях зрения) и чаще всего обнаруживались в небольших гнездах – очагах отсева на периферии фронта инвазии, их наличие в 50% случаев сопровождается рыхлой крупноячеистой стромой с фрагментированными волокнами и в 70% случаев – воспалительным лимфоцитарным инфильтратом. По-видимому, данный фенотип связан с амебoidным типом

инвазии и формированием паттерна инвазии по типу «почкования».

Клетки II типа демонстрируют меньшую агрессивность: число митозов в 5 полях зрения 4 ± 2 , формируют тубулярный или альвеолярный паттерн, если имеются гнезда инвазии на периферии по типу «почкования», то как правило крупные. Строма в 93% хорошо выражена, с плотно уложенными волокнами, лимфоцитарный инфильтрат встречается редко (9%) и слабо выражен.

Клетки III типа преимущественно встречаются на периферии крупных опухолевых узлов, тогда как ближе к центру обычно преобладают клетки I или II фенотипа. Число митозов в 50 полях зрения 5 ± 2 , по биологическому поведению в целом схожи с клетками II фенотипа.

Клетки IV фенотипа обнаруживаются нечасто, однако обычны на периферии фронта инвазии, состоящего из клеток I типа (37 ± 10 клеток на 5 полей зрения).

Клетки V типа встречаются нечасто среди клеток I и II типа, однако достоверно чаще встречаются среди клеток I типа, особенно в центре крупных узлов опухолевой ткани (10 ± 3 клеток на 5 полей зрения).

Клетки VI фенотипа обнаруживаются среди опухолевых клеток любого типа, однако достоверно чаще в материале резецированной опухоли после неоадьювантной химиотерапии среди клеток

I фенотипа (56 ± 10 клеток в 5 полях зрения), что оценивается как следствие лекарственного патоморфоза.

Количество данных фенотипов и количество клеток в паренхиме опухоли, принадлежащих к каждому из них, определяет биологическое разнообразие опухоли, которое также можно оценить математически с помощью индекса Шеннона. С этой целью для каждой пациентки были составлены таблицы, учитывающие количество клеток опухолевой паренхимы каждого типа, подсчитываемое на каждом этапе исследования в 5 полях зрения на среднем увеличении.

Таблица 1

Количество клеток каждого из 5 фенотипов, подсчитанное в 5 полях зрения для двух опухолей

А	Количество клеток			
	Этапы:	I	II	III
Фенотипы	I	28	18	-
	II	76	64	-
	III	39	28	-
	IV	0	15	-
	V	0	9	-
	VI	0	27	-
Б	Количество клеток			
	Этапы:	I	II	III
Фенотипы	I	34	18	63
	II	48	50	32
	III	42	0	18
	IV	10	10	5
	V	9	11	7
	VI	15	23	10

Примечание: А – таблица опухоли, не рецидивировавшей в течение 3 лет; Б – таблица опухоли, локально рецидивировавшей на 2 году наблюдения.

На I этапе для не склонных к рецидиву опухолей индекс Шеннона составил $0,923 \pm 0,090$, тогда как для склонных к рецидиву в течение 3 лет опухолей индекс Шеннона составил $1,738 \pm 0,067$.

На II этапе для не склонных к рецидиву опухолей индекс Шеннона составил $1,576 \pm 0,045$, тогда как для склонных к рецидиву в течение 3 лет опухолей индекс Шеннона составил $1,589 \pm 0,076$.

На III этапе для склонных к рецидиву в течение 3 лет опухолей индекс Шеннона составил $1,650 \pm 0,098$.

Обсуждение

Индекс биоразнообразия, или индекс Шеннона, уже использовался для оценки внутриопухолевой гетерогенности опухолей молочной железы, однако в этих исследованиях в качестве оцениваемых фенотипов обычно использовались данные иммуногистохимического исследования [6]. Также оценивался индекс биоразнообразия для метастазов рака молочной железы, однако в этом случае также оценивалось разнообразие генотипов и иммуногистохимических фенотипов опухоли [7]. По результатам данных исследований оказалось, что опухоли, склонные к развитию резистентности к терапии или началу метастатического процесса, отличались большим как генетическим, так и фенотипическим биоразнообразием, из-за чего индекс биоразнообразия может рассматриваться как новый

прогностический фактор [8]. Однако биологическое разнообразие опухоли возможно оценить не только с помощью генетических или иммуногистохимических методов, предварительная оценка возможна уже с помощью гистологических препаратов, окрашенных рутинным методом гематоксилин-эозином. Подобной оценке может препятствовать значительная степень субъективности и отсутствие критериев выбора отдельных фенотипов, однако эта проблема может быть решена с помощью группирования опухолевых клеток на относительно постоянные фенотипы. Отчасти выделение сходных фенотипов используется в концепции лекарственного патоморфоза опухолей [9], однако патоморфоз оценивается в качестве ответа на проведенную терапию и не предполагает выделение и количественную оценку отдельных фенотипов опухоли на всех этапах исследования, сопровождающихся получением гистологического материала [10]. Реализации подобного подхода посвящено настоящее исследование.

В нашем исследовании также оказалось, что биологическое разнообразие опухолей, которые склонны к рецидиву или метастазированию в течение 3-летнего наблюдения, выше, чем у опухолей, которые не рецидивировали за время наблюдения. Вероятно, биологическое разнообразие опухоли перед неоадьювантной химиотерапией может быть

одним из факторов, определяющих вероятность рецидива опухоли: чем больше фенотипов имеется в опухоли (соответственно, чем выше индекс Шеннона), тем выше вероятность рецидива опухоли [11]. Вероятно, это может объясняться концепцией клональной селекции: чем более гетерогенна опухоль к моменту действия фактора отбора, тем больше шансов, что какой-либо из этих фенотипов окажется адаптивным в изменившихся условиях (или станет клоном-прогенитором для адаптивного фенотипа) [12]. Вероятно, возникновением подобных резистентных клонов объясняется дальнейшее локорегиональное рецидивирование опухоли после успешного лечения в виде полного ответа на терапию или стабилизации процесса. Этот же механизм объясняет возможность возникновения рецидива в виде отдаленного метастаза, однако в этом случае происходит последовательное изменение векторов отбора: сначала среди множества гетерогенных клонов появляются способные к инвазии и адаптированные к условиям конкретной метастатической ниши, а затем среди метастатических клонов во время проведения химиотерапии происходит отбор по признаку резистентности. Также возможно, что клетки различных фенотипов способны участвовать в формировании различных гистологических паттернов, наличие которых может быть связано с риском дальнейшей прогрессии [13], что может определяться особенностями взаимодействия данных клеток со своим микроокружением [14]. Следовательно, определение меры гетерогенности опухоли с помощью индекса Шеннона позволяет прогнозировать вероятность развития рецидива у конкретного пациента и заранее скорректировать тактику ведения пациента. Вид рецидивной опухоли (местный рецидив, метастаз, одновременно местный рецидив и метастаз) не показал значимой связи с каким-либо типом клеток первичной опухоли или индексом биологического разнообразия как на первом, так и на втором этапе. Рост индекса Шеннона на втором этапе (в резецированной опухоли после неoadъювантной химиотерапии) объясняется, вероятно, появлением среди опухолевых клеток разнообразных дистрофичных форм, которые несколько увеличивают биоразнообразие опухолевых клеток в случае исходно гомогенной популяции. По-видимому, этот же процесс лежит в основе замеченного нами на втором этапе сглаживания разницы по индексу Шеннона среди всех опухолей: у опухолей с исходно высоким индексом Шеннона происходило его снижение вследствие уменьшения количества представленных фенотипов, тогда как исходно гомогенные опухоли с низким значением индекса Шеннона показали его увеличение вследствие лекарственного патоморфоза и увеличения количества дистрофичных клеток.

Выводы

Установлено, что при исследовании гистологических препаратов с окраской гематоксилином-эозином в любой опухоли исследуемой группы

можно выделить относительно постоянные фенотипы, представительство каждого из которых можно оценить количественными способами.

Количество данных фенотипов и количество клеток в паренхиме опухоли, принадлежащих к каждому из них, определяет биологическое разнообразие опухоли, которое также можно оценить математически с помощью индексов Шеннона.

Установлено, что степень биологического разнообразия первичной опухоли до начала неoadъювантной химиотерапии может быть связана с вероятностью рецидива опухоли, оцениваемой в 3-летнем периоде: чем больше фенотипов представлено в опухоли и чем более они многочисленны (соответственно, чем выше индекс Шеннона), тем выше вероятность рецидива опухоли. Следовательно, определение этих показателей позволяет прогнозировать вероятность развития рецидива у конкретного пациента и вовремя скорректировать диагностические и терапевтические мероприятия (определить группу риска рецидива с ее дальнейшим углубленным мониторингом, выбрать более радикальную и агрессивную терапевтическую стратегию). Отмечается, что после начала неoadъювантной химиотерапии все опухоли продемонстрировали усреднение индексов биоразнообразия: у опухолей с исходно высоким индексом Шеннона происходило его снижение вследствие уменьшения количества представленных фенотипов, тогда как исходно гомогенные опухоли с низким значением индекса Шеннона показали его увеличение вследствие лекарственного патоморфоза и увеличения количества дистрофичных клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90054.

Список литературы

1. Sung H. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung, J. Ferlay, R. Siegel et al. // *CA: a cancer journal for clinicians*. – 2021. – Т. 71. – №. 3. – P. 209-249.
2. Phung M. T. Prognostic models for breast cancer: a systematic review / M. T. Phung, S. T. Tin, J. M. Elwood // *BMC cancer*. – 2019. – Т. 19. – №. 1. – P. 1-18.
3. Cheung K. L. Treatment Strategies and Survival Outcomes in Breast Cancer / K. L. Cheung. // *Cancers* – 2020. – Т. 12. – №. 3. – P. 735. doi:10.3390/cancers12030735
4. Foulon A. Beyond Chemotherapies: Recent Strategies in Breast Cancer Treatment / A. Foulon, P. Theret, L. Rodat-Despoix, P. Kischel // *Cancers*. – 2020. – Т. 12. – №. 9. – P. 2634.
5. Romero-Arias J. R. Model for breast cancer diversity and spatial heterogeneity / J. R. Romero-Arias, G. Ramírez-Santiago, J. X. Velasco-Hernández et al. // *Physical Review E*. – 2018. – Т. 98. – №. 3. – P. 1-13.
6. Rye I. H. Intratumor heterogeneity defines treatment-resistant HER 2+ breast tumors / I. H. Rye,

A. Trinh, A. B. Sætersdal et al. // *Molecular oncology*. – 2018. – Т. 12. – №. 11. – P. 1838-1855.

7. Almendro V. Genetic and phenotypic diversity in breast tumor metastases / V. Almendro, H. J. Kim, Y. K. Cheng et al. // *Cancer research*. – 2014. – Т. 74. – №. 5. – С. 1338-1348.

8. Chung Y. R. Diversity index as a novel prognostic factor in breast cancer / Y. R. Chung, H. J. Kim, Y. A. Kim et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Т. 8. – №. 57. – P. 97114-97126.

9. Грабовой А. Н. Гистологическая оценка ответа опухоли на химио-/лучевую терапию / А. Н. Грабовой, Т. О. Тарасова, М. В. Кошубарова // *Клиническая онкология*. – 2012. – №. 2. – С. 138-143.

10. Павликова О. А. Клинико-рентгенологическая оценка эффективности предоперационной лекарственной терапии при различных биологических подтипах рака молочной железы стадий T1-3N0-1M0 / О. А. Павликова, И. В. Поддубная, И. В. Колядина и др. // *Современная онкология*. – 2017. – Т. 19. – №. 4. – С. 17-22.

11. Pareja F. Breast cancer heterogeneity: roles in tumorigenesis and therapeutic implications / F. Pareja,

C. Marchiò, F. C. Geyer et al. // *Current Breast Cancer Reports*. – 2017. – Т. 9. – №. 1. – P. 34-44.

12. Caswell-Jin J. L. Clonal replacement and heterogeneity in breast tumors treated with neoadjuvant HER2-targeted therapy / J. L. Caswell-Jin, K. McNamara, J. G. Reiter et al. // *Nature communications*. – 2019. – Т. 10. – №. 1. – P. 1-12.

13. Геращенко Т.С. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии / Т.С. Геращенко, М.В. Завьялова, Е.В. Денисов и др. // *Acta Naturae* (русскаяязычная версия). – 2017. – №1. – P. 60-72.

14. Таширева Л.А. Характеристика способности опухолевых клеток различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы модулировать иммуно-воспалительные реакции / Л.А. Таширева, Т.С. Геращенко, Е.В. Денисов, и др. // *Вопросы онкологии*. – 2020. – Т. 66. – №. 3. – С. 270-276.