

АНАЛИЗ ПРЕДИКТОРОВ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ МЕСТНО- РАСПРОСТРАНЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Алиев К. А., Макалиш Т. П., Дорош Н. В., Зяблицкая Е. Ю.

Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С. И. Георгиевского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (Медицинский институт им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»), 295051, бул. Ленина, 5/7, Симферополь, Россия

Для корреспонденции: Зяблицкая Евгения Юрьевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, Медицинский институт им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», e-mail: evgu79@mail.ru

For correspondence: Evgeniia Yu. Ziablitskaya, MD, Leading Researcher at the Central Research Laboratory, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky V. I. Vernadsky Crimean Federal University (Medical Institute named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU), e-mail: evgu79@mail.ru

Information about authors:

Aliiev K. A., <https://orcid.org/0000-0003-3911-1245>

Makalish T. P., <https://orcid.org/0000-0003-1884-2620>

Dorosh N. V., <https://orcid.org/0009-0000-4279-8936>

Zyablitskaya E. Yu., <http://orcid.org/0000-0001-8216-4196>

РЕЗЮМЕ

В настоящее время по данным мировой и российской статистики показатели заболеваемости и смертности при раке молочной железы растут. Стадия выявленного злокачественного новообразования, определяющая тактику лечения и отдаленные параметры выживаемости, несмотря на развитие технологий и методик диагностических скринингов, редко представлена начальными этапами роста I-II, чаще это местно-распространенные формы. В связи с этим, большинство пациентов требуют проведения неоадьювантной химиотерапии, к которой опухолевые клетки могут проявить резистентность. Фактором, определяющим чувствительность опухоли к терапии, является комплекс молекулярно-биологических параметров ее микроокружения. Целью данного исследования стало определение предикторов рефрактерности к химиотерапии у больных местно-распространенным раком молочной железы, индивидуализация алгоритма лекарственной терапии его резистентных форм. Материал и методы. Ретроспективное исследование проведено на 24 пациентах ГБУЗ РК «Крымский республиканский онкологический клинический диспансер им. В. М. Ефетова» возрастом 40-76 лет. Критерии включения: подтвержденный диагноз местно-распространенного РМЖ, трижды негативный или люминальный В Her-2/neu отрицательный морфологический подтип опухоли, получение не менее 2 курсов неоадьювантной химиотерапии. На первом этапе лечения пациенты получили терапию по схеме антрациклины (схема - AC (доксорубин 60 мг/м² в/в внутривенно, циклофосфамид 600 мг/м² в/в), далее таксаны (паклитаксел 175 мг/м²). Критерии исключения: Her-2-положительный статус опухоли или хороший ответ на химиотерапию. Все пациентки разделены на 4 группы по 6 человек в зависимости от морфологического подтипа опухоли и схемы химиотерапии, на которой отмечался рост первичной опухоли и/или метастатических регионарных лимфоузлов. Группа 1: больные трижды негативным раком с ростом опухоли на фоне терапии таксанами. Группа 2: пациентки с трижды негативным раком и местной опухолевой прогрессией на фоне терапии антрациклинами. Группа 3: пациентки с прогрессией гормонозависимого мРМЖ на фоне терапии таксанами. Группа 4: пациентки с люминальным раком и отрицательной динамикой зафиксированной при проведении химиотерапии по схеме AC (антрациклиновые противоопухолевые препараты). Результаты. Фрагменты опухоли и ткани с сохранными протоками изучены методом иммуногистохимии, определена экспрессия маркеров микроокружения: CD4, CD8, CD20, CD68, VEGF, ANG2, HIF-1 α стандартными рекомендованными протоколами преаналитического и аналитического этапа на иммуногистостейнере Bond-MAX (Leica) с последующей математико-статистической обработкой данных непараметрическими методами. Отмечена слабая инфильтрация лимфоцитами представленных образцов, вне зависимости от ее морфологического подтипа и применяемой схемы терапии. При этом, многофакторный анализ выявил существенную степень влияния молекулярно-биологического подтипа опухоли и варианта резистентности к цитостатикам на экспрессию маркеров ангиогенеза. Морфологический подтип опухоли влияет наиболее интенсивно на выраженность реакции с антителами к VEGF и экспрессию HIF-1 α . При этом на экспрессию ангиопоетина влияет исключительно вариант резистентности опухоли, однако сила данного влияния невелика. Заключение. Таким образом, слабая инфильтрация лимфоцитами делает малоэффективной иммунотерапию резистентных форм рака молочной железы. Более чувствительной и эффективной может оказаться терапия, направленная на блокирование неоангиогенеза, в случаях резистентного люминального В, Her-2/neu негативного местно-распространенного рака.

Ключевые слова: рак молочной железы, неоадьювантная химиотерапия, лекарственная устойчивость, микроокружение опухоли, иммуногистохимия.

ANALYSIS OF PREDICTORS OF CHEMORESISTANCE IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT OF LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER

Aliev K. A., Makalish T. P., Dorosh N. V., Zyablitskaya E. Yu.

Medical Institute named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

Currently, according to world and Russian statistics, the incidence and mortality rates of breast cancer are growing. The stage of the detected malignant neoplasm, which determines the treatment tactics and remote survival parameters, despite the development of technologies and methods of diagnostic screening, is rarely represented by the initial stages of growth I-II, more often these are locally advanced forms. In this regard, most patients require neoadjuvant chemotherapy, to which tumor cells can show resistance. The factor determining the sensitivity of the tumor to therapy is a complex of molecular biological parameters of its microenvironment. The purpose of this study was to determine the predictors of refractoriness to chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer, individualization of the algorithm of drug therapy for its resistant forms. Material and methods. A retrospective study was conducted on 24 patients of the State Healthcare Institution of the Republic of Crimea «Crimean Republican Oncology Clinical Dispensary named after V. M. Efetov» aged 40-76 years. Inclusion criteria: confirmed diagnosis of locally advanced breast cancer, triple negative or luminal B Her-2/neu negative morphological subtype of the tumor, receipt of at least 2 courses of neoadjuvant chemotherapy. At the first stage of treatment, patients received therapy according to the anthracycline regimen (scheme - AC (doxorubicin 60 mg / m² intravenously, cyclophosphamide 600 mg / m² intravenously)), then taxanes (paclitaxel 175 mg / m²). Exclusion criteria: Her-2-positive tumor status or a good response to chemotherapy. All patients were divided into 4 groups of 6 people depending on the morphological subtype of the tumor and the chemotherapy regimen, which noted the growth of the primary tumor and / or metastatic regional lymph nodes. Group 1: patients with triple-negative cancer with tumor growth during taxane therapy. Group 2: patients with triple-negative cancer and local tumor progression during anthracycline therapy. Group 3: patients with progression of hormone-dependent mBC during taxane therapy. Group 4: patients with luminal cancer and negative dynamics recorded during chemotherapy according to the AC regimen (anthracycline antitumor drugs). Results. Tumor fragments and tissues with preserved ducts were studied by immunohistochemistry, expression of microenvironment markers was determined: CD4, CD8, CD20, CD68, VEGF, ANG2, HIF-1 α using standard recommended protocols of the preanalytical and analytical stages on the Bond-MAX immunohistostainer (Leica) with subsequent mathematical and statistical data processing using nonparametric methods. Weak lymphocyte infiltration of the presented samples was noted, regardless of its morphological subtype and the applied therapy regimen. At the same time, multivariate analysis revealed a significant degree of influence of the molecular-biological tumor subtype and the variant of resistance to cytostatics on the expression of angiogenesis markers. The morphological subtype of the tumor has the most intense effect on the intensity of the reaction with antibodies to VEGF and the expression of HIF-1 α . At the same time, the expression of angiopoietin is affected exclusively by the variant of tumor resistance, but the strength of this effect is small. Conclusion. Thus, weak lymphocyte infiltration makes immunotherapy of resistant forms of breast cancer ineffective. Therapy aimed at blocking neoangiogenesis may be more sensitive and effective in cases of resistant luminal B, Her-2 / neu negative locally advanced cancer.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, drug resistance, tumor microenvironment, immunohistochemistry.

Несмотря на значительные достижения в понимании биологии рака молочной железы (РМЖ), это заболевание доминирует в заболеваемости и смертности у женщин во всем мире. Ежегодно в мире диагностируется почти 2,3 миллиона новых случаев РМЖ, и более 660 000 женщин умирают от этого заболевания. Это составляет почти 11,6 % новых случаев заболевания и 6,9 % случаев смерти от рака [1]. Прогнозируется, что к 2050 году заболеваемость РМЖ увеличится до 3,2 миллиона случаев в год [2].

Наиболее изученным опухолевым предиктором является стадия злокачественного новообразования (ЗНО), этот прогностический показатель, во многом, определяет тактику лечения РМЖ, коррелируя с показателями отдаленной выживаемости. Как правило, самые высокие показатели пятилетней выживаемости наблюдаются при локализованном РМЖ (0 и I стадия – до 99 %),

прогрессивно снижаясь при регионарной метастазировании (II и III стадия – 87 %) и демонстрирует худшие показатели при отдаленном метастазировании (32 %). Больные местно-распространенным раком молочной железы (мрРМЖ) также подвержены высокому риску смертности от прогрессии заболевания в виде отдаленного метастазирования [3]. Медиана выживаемости в клинических исследованиях, в которых изучалось специализированное лечение больных мрРМЖ, составляет от 28 до 66 месяцев. Общая пяти- и десятилетняя выживаемость составляет 40-75 % и 30–40 % соответственно [2]. Эти данные ясно указывают на то, что для борьбы с мрРМЖ необходимы более эффективные методы лечения.

Современный стандарт лечения мрРМЖ основан на комплексном подходе, который включает три ключевых этапа: а) неoadъювантный (предо-

перационный) этап: лекарственная терапия (химио-, гормонотерапия или таргетная терапия); б) хирургический этап: выполнение радикальной операции различного объема; в) адьювантный (послеоперационный) этап: лекарственная и/или лучевая терапия направлена на профилактику метастатического процесса в ложе опухоли, регионарных лимфоузлов и отдаленных органах-мишенях. Системное лекарственное лечение мрРМЖ демонстрирует хорошие результаты [4]. Задачами неoadьювантной лекарственной (химиотерапии) терапии (НХТ) является девитализация и уменьшение размеров опухоли, повышение резектабельности, с целью проведения операции с радикальным результатом и нивелирования метастатической болезни.

Концепция работы многих противоопухолевых препаратов заключается в метаболической инактивации опухолевых клеток для достижения полного опухолевого регресса, и препараты НХТ для РМЖ не являются исключением [5]. При этом опухолевые клетки способны развивать устойчивость к препаратам за счет снижения их активации либо замедление метаболизма для инактивации соединений. Механизм лекарственной резистентности РМЖ сложен и представляет собой многофакторный и многоэтапный процесс. Это результат взаимодействия раковых клеток внутри опухоли, а также тесно связанный с ролью клеток РМЖ и окружающей их среды. Микроокружение опухоли (ТМЕ) представляет собой сложную интегрированную систему, в его состав входят опухоль-ассоциированные клетки и внеклеточный матрикс, разнообразные стромальные клетки, иммунные клетки, сигнальные молекулы (цитокины, факторы роста, хемокины и др.). Эти компоненты взаимодействуют в сложных клеточно-клеточных и клеточно-матриксных коммуникациях, формируя микросреду, благоприятную для роста и метастазирования опухолевых клеток. Динамическое взаимодействие между раковыми клетками и компонентами ТМЕ может как способствовать, так и сдерживать прогрессирование заболевания [6].

Целью данного исследования явилось определение предикторов рефрактерности к химиотерапии у больных местно-распространенным РМЖ, индивидуализация алгоритма лекарственной терапии резистентного местно-распространенного РМЖ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Ретроспективное исследование проведено на 24 пациентках ГБУЗ РК «Крымский республиканский онкологический клинический диспансер им. В. М. Ефетова» возрастом от 40 до 76 лет. Критериями включения в исследование

послужили подтвержденный диагноз мрРМЖ, трижды негативный или люминальный В Her-2/neu отрицательный морфологический подтип опухоли, получение не менее 2 курсов неoadьювантной химиотерапии. На первом этапе лечения цитостатиками все пациенты получили НХТ по схеме антрациклины (схема - AC (доксорубин 60 мг/м² в/в внутривенно, циклофосфамид 600 мг/м² в/в)), далее таксаны (паклитаксел 175 мг/м²). Критериями исключения послужили Her-2-положительный статус опухоли или хороший ответ на химиотерапию.

Все пациентки были разделены на 4 группы поровну согласно морфологическому подтипу опухоли и схеме химиотерапии, на которой отмечался рост первичной опухоли и/или метастатических регионарных лимфоузлов. В первую группу вошли пациентки с трижды негативным мрРМЖ, с ростом опухоли на фоне терапии таксанами, во вторую – больные трижды негативным мрРМЖ с местной опухолевой прогрессией на фоне терапии антрациклинами, третью группу составили пациентки с прогрессией гормонозависимого мрРМЖ на фоне терапии таксанами, а четвертую – с люминальным мрРМЖ, у которых отрицательная динамика была зафиксирована при проведении химиотерапии по схеме AC (антрациклиновые противоопухолевые препараты).

Для исследования были отобраны залитые в парафин фрагменты опухоли, в которых помимо инвазивного компонента опухоли присутствовали участки ткани с сохранными протоками. Из блоков изготавливали срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивали методом иммуногистохимии с маркерами к CD4 (Leica, clone 4B12), CD8 (Elabscience, clone YN00246m), CD20 (Leica, clone L26), CD68 (Abcam, clone 125212), VEGF (Thermo Scientific, clone RB-9031-P1), ANGP2 (Abcam, clone 8452), HIF-1 α (Epitomics, clone EP118). Протокол окрашивания включал в себя депарафинизацию, высокотемпературную демаскировку эпитопа, блокировку эндогенной пероксидазы, инкубацию с первичным антителом, визуализацию с помощью системы детекции Bond Polymer Refine Detection System (Leica) на основе диамибензидина и пероксидазы хрена, а также полимерного усилителя сигнала. Окрашивание производилось в автоматическом иммуногистоштейнере Bond-MAX (Leica). Окрашенные препараты заключали под покровное стекло и сканировали на сканере гистопрепаратов Aperio CS2 с увеличением в 40 крат. Анализ изображений производили с использованием ПО Aperio Image Scope. На каждом стекле в пяти полях зрения для опухолевой ткани и пяти полях зрения для окружающей опухоль сохранной ткани оценивали интенсивность окрашивания на VEGF в баллах по шкале

Allred Score, для стромы – количество позитивно окрашенных клеток в поле зрения. Для остальных маркеров также подсчитывали число клеток в поле зрения, имеющих позитивное окрашивание не зависимо от его интенсивности. Для лейкоцитарных маркеров отдельно посчитывали число позитивных клеток в зоне демаркации опухоли.

Статистическую обработку данных осуществляли в программе Statistica 10. Поскольку выборки были небольшими, а характер данных имел прерывный или категориальный характер, для сравнения групп применяли непараметрические методы (U-критерий Манна-Уитни, факторный анализ ANOVA). С учетом множественности сравнений (выполняли 4 попарных сравнения

групп) для определения уровня значимости была введена поправка Бонферрони, а уровень значимости p рассчитан как равный 0,0125.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У пациенток с резистентными формами мрРМЖ опухоли имеют, как правило, «холодный» иммунологический фенотип, и являются мало нефилтрованными лимфоидными клетками как в самой опухоли, так и в прилежащей к опухоли ткани. При этом выявились различия в преобладании определенных типов лейкоцитов в зависимости от морфологического подтипа опухоли и устойчивости к определенным препаратам (Таблица 1).

Таблица 1. Иммунологический профиль опухолей молочной железы при разных типах резистентности (Me(Q1; Q3)).

Table 1. Immunological profile of breast tumors with different types of resistance (Me(Q1; Q3)).

Маркер	Морфологический подтип	Тройной негативный		Люминальный В	
	Схема НХТ	Таксаны	АС	Таксаны	АС
	Код группы	1, n=6	2, n=6	3, n=6	4, n=6
CD68	число клеток в строме опухоли, шт	0(0;1)	1,5(1;4)	1(0;4)	1(1;2)
	число клеток в зоне демаркации, шт	5(3;7)	2,5(1;4)	3(2;4)	4(4;5)
	число клеток в прилежащей к опухоли строме, шт	5(3;7)	3(0;4)	3(1;7)	6(5;6)
CD20	число клеток в строме опухоли, шт	0(0;0)	0,5(0;2)	0(0;0)	0(0;1)
	число клеток в зоне демаркации, шт	0(0;1)	0,5(0;3)	0(0;2)	0(0;0)
	число клеток в прилежащей к опухоли строме, шт	0(0;1)	1(0;1)	0(0;0)	1(0;1)
CD4	число клеток в строме опухоли, шт	3(0;13)	2(0;5)	0(0;1)	1(0;2)
	число клеток в зоне демаркации, шт	12(6;22)	5,5(3;7)*	6(3;16)	3(0;5)
	число клеток в прилежащей к опухоли строме, шт	6(3;14)	5(3;8)	3(2;5)	1(0;2)#
CD8	число клеток в строме опухоли, шт	2(0;11)	0(0;6)	2(0;9)	3(2;3)
	число клеток в зоне демаркации, шт	7(3;19)	4(1;13)	6(3;19)	5(0;5)
	число клеток в прилежащей к опухоли строме, шт	3(2;4)	3(2;4)	3(0;4)	1(1;3)

Примечания: * - достоверные отличия от группы с аналогичным морфологическим подтипом, но иной схемой лечения, $p=0,009033$. #- достоверные отличия от группы с другим морфологическим подтипом, но идентичной схемой лечения, $p=0,010113$. °- Антрациклиновые противоопухолевые препараты

При таксан-резистентном трижды негативном мрРМЖ в опухоли преобладают цитотоксические и хелперные Т-лимфоциты, особенно многочисленные в зоне демаркации опухоли. Макрофаги также расположены преимущественно по периферии опухолевой ткани. В-лимфоциты практически не встречаются.

Схожая картина наблюдается при прогрессировании тройного негативного мрРМЖ на антра-

циклиновых цитостатиках. При этом наблюдаются достоверное уменьшение числа CD4+ клеток в зоне демаркации, незначительное увеличение числа В-лимфоцитов и проникновение макрофагов в опухолевую ткань.

В группах больных люминальным мрРМЖ наблюдается несколько большая инфильтрация макрофагами, практически полное отсутствие В-лимфоцитов и снижение числа CD4+ клеток

относительно исследуемых подгрупп с трижды негативным РМЖ, что носит статистически значимый характер. При этом несколько увеличивается число Т-хелперов в опухолевой ткани в случаях антрациклин-резистентного мРМЖ

(прогрессия на схеме АС).

Более динамично и значимо изменялась экспрессия факторов ангиогенеза, таких как VEGF, ANG2 и фактора гипоксии HIF-1 α (таблица 2).

Таблица 2. Экспрессия маркеров ангиогенеза при различных резистентных формах РМЖ (Me(Q1; Q3)).
Table 2. Expression of angiogenesis markers in various resistant forms of breast cancer (Me(Q1; Q3)).

Маркер	Морфологический подтип	Тройной негативный		Люминальный В	
	Схема НХТ	Таксаны	АС	Таксаны	АС
	Код группы	1, n=6	2, n=6	3, n=6	4, n=6
VEGF	эпителий опухоли PS, баллы	2(2;3)	2(2;3)	2(1;3)	1(1;2)
	эпителий опухоли IS, баллы	1(1;1)	1(1;2)	2(2;3)#	1(1;3)
	эпителий опухоли TS, баллы	3(3;4)	3(3;5)	4(3;6)#	2(2;5)
	эпителий здоровый PS, баллы	0(0;2)	1,5(1;2)	2(0;2)	2(2;2)
	эпителий здоровый IS, баллы	0(0;1)	1(1;1)	3(0;3)#	3(2;3)
	эпителий здоровый TS, баллы	0(0;3)	2,5(2;3)	4(0;5)#	5(4;5)
	число клеток в строме опухоли, шт	9(5;14)	5(3;6)	24(16;32)	5(3;6)*
	число клеток в строме здоровой ткани, шт	52(37;65)	15,5(10;19)*	39(23;86)	16(15;26)*
HIF-1 α	число эпителиоцитов в опухоли, шт	0(0;3)	25(11;34)	10(5;19)	10(9;20)
	число клеток в строме опухоли, шт	5(3;7)	4(3;6)	3(1;4)#	3(3;3)
	число эпителиоцитов в здоровой ткани, шт	0(0;1)	0,5(0;2)	0(0;0)	0(0;0)
	число эпителиоцитов в строме здоровой ткани, шт	6(2;6)	3(1;6)	3(3;4)	2(2;3)
ANGP2	число клеток в строме опухоли, шт	39(30;59)	29(21;35)*	32(0;62)	20(10;29)
	число эпителиоцитов опухоли, шт	56(43;61)	25(21;35)	36(22;38)	21(11;28)
	число клеток в строме здоровой ткани, шт	31(21;34)	27(13;31)	32(30;46)	20(15;30)
	число эпителиоцитов здоровой ткани, шт	3(1;4)	1,5(1;2)*	2(1;4)	4(2;5)

Примечания: * - достоверные отличия от группы с аналогичным морфологическим подтипом, но иной схемой лечения, $p \leq 0,0125$. #- достоверные отличия от группы с другим морфологическим подтипом, но идентичной схемой лечения, $p \leq 0,0125$. ⁰ - Антрациклиновые противоопухолевые препараты

Экспрессия VEGF в опухолевой и прилегающей ткани невысока, и редко превышает 2 балла по шкале AllredScore как в интенсивности окрашивания, так и по числу позитивных клеток. При этом в группе больных люминальным В мРМЖ опухоли экспрессия VEGF выше, чем при трижды негативном подтипе, особенно при резистентности к таксанам, что носит статистически значимый характер как для собственно опухолевой ткани ($p=0,000001$), так и для окружающих ее структур молочной железы ($p=0,001448$). Также характерна высокая экспрессия данного фактора в строме окружающей опухоль ткани, при этом она выше у больных,

резистентным течению на фоне терапии антрациклинами, как при тройном негативном ($p=0,000101$), так и при люминальном В подтипе мРМЖ ($p=0,001240$).

Ангиопоетин 2 высоко экспрессируется в ткани опухоли, при этом более ярко при таксан-резистентном мРМЖ, что достигает статистической значимости у больных трижды негативным мРМЖ ($p=0,003918$). Для окружающей опухоли ткани оказалась характерна экспрессия преимущественно в строме, с сохранением тенденции к более слабой экспрессии у пациенток, с прогрессией на антрациклиновых цитостатиках ($p=0,039105$).

Фактор гипоксии HIF-1 α также наиболее выражен непосредственно в опухоли, и несколько меньше в строме прилежащей ткани. Определяется статистическое значимое снижение экспрессии данного маркера в группе больных таксан-резистентным гормонозависимым мрРМЖ по сравнению с тройным негативным вариантом ($p=0,004574$).

Проведение многофакторного анализа ANOVA выявило существенную степень влияния как молекулярного-биологического опухолевого подтипа, так и вариант резистентности к цитостатикам на экспрессию маркеров ангиогенеза. Влияния изучаемых факторов на степень инфильтрации опухоли лейкоцитами и их соотношение выявлено не было. Морфологический подтип опухоли влияет наиболее интенсивно. В частности, сила данного фактора на интенсивность окрашивания опухолевых клеток антителами к VEGF составила $F=80,62$ при $p\leq 0,000001$, на интенсивность окрашивания прилежащей к опухоли ткани $F=33,10$ при $p\leq 0,000001$. На экспрессию HIF-1 α влияет также исключительно морфологический подтип, однако сила данного влияния существенно ниже ($F=6-9$ при $p\leq 0,0125$). При этом на экспрессию ангиопоетина влияет исключительно вариант резистентности опухоли, однако сила данного влияния также невелика ($F=4-12$ при $p\leq 0,0125$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Опухолевое микроокружение (ТМЕ) представляет собой сложную сеть стромальных клеток, иммунных клеток и внеклеточных компонентов, которые поддерживают опухолевые клетки посредством взаимодействия с сигнальными молекулами и физическими факторами. Продемонстрировано, что взаимодействие между ТМЕ и опухолевыми клетками влияет на агрессивное течение, метастазирование и лекарственную устойчивость [7]. Таким образом, представляется критически важным провести всесторонний анализ микроокружения опухоли (ТМЕ), с акцентом на изучение иммунокомпетентных клеток, и их составляющих.

Результаты нашего исследования выявили значительную инфильтрацию цитотоксическими и хелперными Т-лимфоцитами, преимущественно в зоне опухолевой демаркации (таксан-резистентный вариант), а также статистически значимое уменьшение числа CD4+ клеток в зоне демаркации (антрациклин-резистентный вариант) в трижды негативных опухолях молочной железы с резистентным к терапии течением. Многочисленные исследования продемонстрировали, что CD4+ Т-клетки играют ключевую роль в процессах онкогенеза, метастазирования,

а также в клинической диагностике и прогнозировании эффективности химиотерапевтических режимов. Функциональная гетерогенность и парадоксальное поведение CD4+ Т-клеток обусловлены сложностью микроокружения опухоли, что делает их многогранное влияние на опухолевый процесс предметом интенсивного изучения. Эти клетки демонстрируют разнообразные фенотипические и функциональные состояния, регулируя иммунный ответ и координируя активность других иммунокомпетентных клеток. В результате их действия оказывают существенное влияние на опухолевое поведение и реакцию на терапию, что, в свою очередь, определяет прогноз заболевания [8].

В частности, различные субпопуляции CD4+ Т-клеток вносят дифференцированный вклад в противоопухолевый иммунитет. Они модулируют гуморальный иммунный ответ, активируют В-клетки и CD8+ Т-клетки, способствуя их цитотоксической активности против опухолевых клеток. Цитотоксические CD4+ Т-клетки непосредственно участвуют в элиминации злокачественных клеток, что подчеркивает их значимость в противоопухолевой защите организма [8].

Еще одним ключевым фактором резистентности является гипоксия, характерная для быстрорастущих опухолей с высоким метаболизмом. Внутриопухолевая гипоксия существенно ухудшает прогноз заболевания. Поскольку в опухолевых тканях ангиогенез протекает более интенсивно, более того индукция ангиогенеза в опухоли стимулирует ее метастазированию. В свете проблемы интратуморальной гипоксии особое внимание уделяют регуляторному белку HIF-1 α (фактор, индуцированный гипоксией) [9]. Поиск ингибиторов является актуальным направлением в экспериментальной онкологии. По результатам представленного исследования, в группе больных таксан-резистентным гормонозависимым мрРМЖ по сравнению с тройным негативным вариантом было выявлено статистическое значимое снижение экспрессии HIF-1 α .

Гипоксия, опосредованная фактором HIF-1 α , влияет на свойства стволовых клеток и способствует развитию рефрактерности к химиотерапии, активирует фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [10]. VEGF, стимулятор ангиогенеза, подавляет опухолевый иммунитет, ингибируя созревание дендритных клеток, и индуцирует иммуносупрессивные клетки, такие как регуляторные Т-клетки, ассоциированные с опухолью макрофаги.

Анализ сосудистых факторов показал разнонаправленные изменения: экспрессия VEGF в опухоли в группе больных люминальным В мрРМЖ была статически значимо выше, чем

при трижды негативном подтипе, особенно при резистентности к таксанам, тогда как ANGP2 высоко экспрессируется в ткани опухоли при таксан-резистентном трижды негативном мРМЖ. Это соответствует известным функциям данных маркеров: VEGF стимулирует патологический ангиогенез, в то время как ANGP2 считается антиангиогенным фактором, способствующим регрессии сосудов [11]. Уровень циркулирующего VEGF может динамически меняться в ходе лечения и служить индикатором резистентности [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, слабая инфильтрация лимфоцитами делает малоэффективной иммунотерапию резистентных форм РМЖ вне зависимости от ее морфологического подтипа и ранее применяемой схемы НХТ. Более чувствительной и эффективной может оказаться терапия, направленная на блокирование неоангиогенеза, в случаях резистентного люминального В, Her-2/neu негативного мРМЖ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа финансирована государственным заданием по науке Министерства высшего образования и науки Российской Федерации FZEG-2023-0009 «Изучение гетерогенности микроокружения опухоли как фактора ее агрессивности и резистентности к терапии».

Funding. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, state assignment FZEG-2023-0009 «Study of the heterogeneity of the tumor microenvironment as a factor in its aggressiveness and resistance to therapy».

ЛИТЕРАТУРА

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
2. Kim J., Harper A., McCormack V., Sung H., Houssami N., Morgan E., Mutebi M., Garvey G., Soerjomataram I., Fidler-Benaoudia M.M. Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. *Nat Med.* 2025;31(4):1154-1162. doi:10.1038/s41591-025-03502-3.
3. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21387.

4. Klein J., Tran W., Watkins E., Vesprini D., Wright F. C., Look Hong N. J., Ghandi S., Kiss A., Czarnota G. J. Locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and adjuvant radiotherapy: a retrospective cohort analysis. *BMC Cancer.* 2019;19(1):306. doi:10.1186/s12885-019-5499-2.

5. Wang H., Mao X. Evaluation of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* 2020;14:2423-2433. doi: 10.2147/DDDT.S253961.

6. van der Spek Y. M., Kroep J. R., Tollenaar R. A. E. M., Mesker W. E. Chemotherapy resistance and stromal targets in breast cancer treatment: a review. *Mol Biol Rep.* 2020; 47, 8169-8177. doi:10.1007/s11033-020-05853-1.

7. Зяблицкая Е. Ю., Кубышкин А. В., Сорокина Л. Е., Серебрякова А. В., Алиев К. А., Максимова П. Е., Лазарев А. Э., Балакчина А. И., Головкин И. О. Клеточное микроокружение как объект таргетной терапии злокачественных новообразований. *Успехи молекулярной онкологии.* 2023;10(4):8-20. doi:10.17650/2313-805X-2023-10-4-8-20.

8. An Q., Duan L., Wang Y., Wang F., Liu X., Liu C., Hu Q. Role of CD4+ T cells in cancer immunity: a single-cell sequencing exploration of tumor microenvironment. *J Transl Med.* 2025;23(1):179. doi:10.1186/s12967-025-06167-1.

9. Rashid M., Zadeh L. R., Baradaran B., Molavi O., Ghesmati Z., Sabzichi M., Ramezani F. Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression. *Gene.* 2021;798:145796. doi:10.1016/j.gene.2021.145796.

10. Wang Y., Wang X., Zhao H., Liang B., Du Q. Clusterin confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in breast cancer cells through NF-kappa B activation and Bcl-2overexpression. *J. Chemother.* 2012;24:348-357. doi:10.1179/1973947812Y.0000000049

11. Shen D. W., Goldenberg S., Pastan I., Gottesman M. M. Decreased accumulation of (14C) carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. *J Cell Physiol* 2000;183(1):108-16. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<108::AID-JCP13>3.0.CO;2-4.

12. Davis N. M., Sokolosky M., Stadelman K., et al. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget.* 2014;5(13):4603-50. doi:10.18632/oncotarget.2209.

REFERENCES

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of

Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.

2. Kim J., Harper A., McCormack V., Sung H., Houssami N., Morgan E., Mutebi M., Garvey G., Soerjomataram I., Fidler-Benaoudia M. M. Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. *Nat Med.* 2025;31(4):1154-1162. doi: 10.1038/s41591-025-03502-3.

3. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):7–30. doi: 10.3322/caac.21387.

4. Klein J., Tran W., Watkins E., Vesprini D., Wright F. C., Look Hong N. J., Ghandi S., Kiss A., Czarnota G. J. Locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and adjuvant radiotherapy: a retrospective cohort analysis. *BMC Cancer.* 2019;19(1):306. doi:10.1186/s12885-019-5499-2.

5. Wang H., Mao X. Evaluation of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* 2020;14:2423–2433. doi: 10.2147/DDDT.S253961.

6. van der Spek Y.M., Kroep J. R., Tollenaar R. A. E. M., Mesker W. E. Chemotherapy resistance and stromal targets in breast cancer treatment: a review. *Mol Biol Rep.* 2020; 47, 8169-8177. doi:10.1007/s11033-020-05853-1.

7. Zyablitskaya E. Yu., Kubyshkin A. V., Sorokina L. E., Serebryakova A. V., Aliev K. A., Maksimova P. E., Lazarev A. E., Balakchina A. I., Golovkin I. O. Cellular microenvironment

as an object of targeted therapy for malignant neoplasms. *Advances in Molecular Oncology.* 2023;10(4):8-20. (In Russ.) doi:10.17650/2313-805X-2023-10-4-8-20.

8. An Q., Duan L., Wang Y., Wang F., Liu X., Liu C., Hu Q. Role of CD4+ T cells in cancer immunity: a single-cell sequencing exploration of tumor microenvironment. *J Transl Med.* 2025;23(1):179. doi:10.1186/s12967-025-06167-1.

9. Rashid M., Zadeh L. R., Baradaran B., Molavi O., Ghesmati Z., Sabzichi M., Ramezani F. Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression. *Gene.* 2021;798:145796. doi:10.1016/j.gene.2021.145796.

10. Wang Y., Wang X., Zhao H., Liang B., Du Q. Clusterin confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in breast cancer cells through NF-kappa B activation and Bcl-2overexpression. *J. Chemother.* 2012;24:348-357. doi:10.1179/1973947812Y.0000000049.

11. Shen D. W., Goldenberg S., Pastan I., Gottesman M. M. Decreased accumulation of (14C) carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. *J Cell Physiol* 2000;183(1):108-16. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<108:AID-JCP13>3.0.CO;2-4.

12. Davis N. M., Sokolosky M., Stadelman K., et al. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget.* 2014;5(13):4603-50. doi: 10.18632/oncotarget.2209.