

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-103-113>

Механизмы лекарственной устойчивости к неоадьювантной химиотерапии при раке молочной железы

К.А. Алиев, Е.Ю. Зяблицкая, Т.П. Макалиш, Л.Е. Сорокина, Э.Р. Асанова

Орден Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»; Россия, 295051 Симферополь, б-р Ленина, 5/7

Контакты: Евгения Юрьевна Зяблицкая evgu79@mail.ru

Введение. Динамические взаимоотношения между опухолевыми клетками и их микроокружением имеют решающее значение в развитии, прогрессировании злокачественного процесса и формировании лекарственной резистентности.

Цель исследования – изучить молекулярно-генетические характеристики опухолевого микроокружения и механизмы клеточной гибели при резистентном местно-распространенном раке молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. В исследование включены 48 пациенток с РМЖ T2–4N0–3M0–1 (средний возраст $55,6 \pm 9,8$ года) и 29 пациенток сопоставимого возраста с фибroadеномой молочной железы. Согласно дизайну работы больные разделены на группы: в 1-ю группу вошли женщины с РМЖ, резистентным к неоадьювантной химиотерапии ($n = 23$), во 2-ю – с РМЖ и полным ответом на неоадьювантную химиотерапию ($n = 25$), в контрольную – с фибroadеномой ($n = 29$). Экспрессию CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, фактора некроза опухоли α (TNF- α), фактора роста эндотелия сосудов A (VEGF A), Ang-2, матриксной металлопротеиназы 12 (MMP-12), индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), bcl-2, p53 и CD95 оценивали с помощью иммуногистохимического метода.

Результаты. При фенотипировании иммунных клеток выявлены следующие различия: в ткани опухоли пациенток 1-й группы отмечено значимое снижение числа цитотоксических CD8⁺-клеток по сравнению с тканью опухоли пациенток 2-й ($p = 0,001$) и контрольной ($p = 0,032$) групп, во 2-й группе – значимое увеличение числа CD68⁺-клеток по сравнению с 1-й группой ($p = 0,027$). Цитокиновый профиль опухолевого микроокружения в 1-й группе характеризовался статистически значимой гиперэкспрессией TNF- α по сравнению со 2-й ($p > 0,001$) и контрольной ($p = 0,01$) группами. В отношении апоптотических факторов отмечено значимое снижение экспрессии bcl-2 и p53 в 1-й группе по сравнению со 2-й группой ($p = 0,001$ и $p = 0,02$ соответственно).

Заключение. Представленные результаты могут послужить основой для создания диагностических алгоритмов, обладающих высокой предсказательной значимостью в отношении эффективности неоадьювантной химиотерапии, а также помочь в идентификации новых мишеней для обоснования применения комбинированных методов лечения РМЖ на ранних этапах.

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

Для цитирования: Алиев К.А., Зяблицкая Е.Ю., Макалиш Т.П. и др. Механизмы лекарственной устойчивости к неоадьювантной химиотерапии при раке молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):103–113.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-103-113>

Mechanisms of drug resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer

K.A. Aliev, E.Yu. Zyablitskaya, T.P. Makalish, L.E. Sorokina, E.R. Asanova

Order of the Red Banner of Labor of the Medical Institute named after S.I. Georgievsky, V.I. Vernadsky Crimean Federal University; 5/7 Lenina Bul'var, Simferopol 295006, Russia

Contacts: Evgenia Yur'evna Zyablitskaya evgu79@mail.ru

Introduction. The dynamic relationship between tumor cells and their microenvironment is critical in the development, and progression of the malignant process, and the formation of drug resistance.

Aim. To study the molecular genetic characteristics of the tumor microenvironment and the mechanisms of cell death in resistant locally advanced breast cancer.

Materials and methods. The study included 48 patients with breast cancer T2–4N0–3M0–1 (mean age 55.6 ± 9.8 years), and 29 patients of comparable age with breast fibroadenoma. According to the design of the study, patients were divided into groups: Group 1 included women with breast cancer resistant to neoadjuvant chemotherapy ($n = 23$), Group 2 – with breast cancer and a complete response to neoadjuvant chemotherapy ($n = 25$), control Group – with fibroadenoma ($n = 29$). The expression of markers CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, tumor necrosis factor α (TNF- α), vascular endothelial growth factor A (VEGF A), Ang-2, matrix metalloproteinase 12 (MMP-12), inducible nitric oxide synthase (iNOS), bcl-2, p53, CD95 was assessed using immunohistochemistry.

Results. When phenotyping immune cells, the following differences were obtained: in the tumor tissue of patients in Group 1, a significant decrease in the number of cytotoxic CD8+ cells was noted compared to Group 2 ($p = 0.001$) and control ($p = 0.032$). In Group 2, a significant increase in the number of CD68+ cells was revealed in relation to Group 1 ($p = 0.027$). The cytokine profile of the tumor microenvironment in Group 1 is characterized by statistically significant overexpression of TNF- α compared to Group 2 ($p > 0.001$) and the control Group ($p = 0.01$). With regard to apoptotic factors, noteworthy is the significant decrease in the expression of bcl-2 and p53 in Group 1 compared to Group 2 ($p = 0.001$ and $p = 0.02$ accordingly).

Conclusion. The presented results can serve as the basis for the creation of diagnostic algorithms that have predictive value regarding the effectiveness of NCT, and also to help identify new targets to justify the use of combined breast cancer treatments in the early stage.

Keywords: breast cancer, non-adjuvant chemotherapy, drug resistance, tumor microenvironment

For citation: Aliev K.A., Zyablitskaya E.Yu., Makalish T.P. et al. Mechanisms of drug resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(3):103–113. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-103-113>

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования молочной железы по-прежнему занимают ведущие позиции в структуре онкопатологии среди женщин всего мира [1, 2]. Медико-социальная значимость проблемы рака молочной железы (РМЖ) продиктована ростом заболеваемости, высокими показателями инвалидизации и смертности, в том числе среди женщин молодого возраста. Несмотря на раннюю диагностику, основной причиной, обуславливающей высокие показатели летальных исходов, является прогрессирование заболевания на разных этапах онкологического процесса на фоне безуспешной или недостаточно эффективной терапевтической стратегии [3]. Известно, что для РМЖ характерна высокая гетерогенность как опухолевых клеток, так и их клеточного микроокружения, что, в свою очередь, может способствовать развитию лекарственной резистентности опухоли и повышению ее метастатического потенциала [4].

Результаты исследований последних лет показали, что вариабельность клеточного состава и функциональная активность клеток, инфильтрирующих строму опухоли, могут выступать в качестве ключевых факторов регуляции развития злокачественного процесса [5]. Согласно данным литературы, в процессе формирования ландшафта опухоли участвуют клетки (макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты) [6], сигнальные молекулы (синтазы оксида азота) [7], ростовые факторы (фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), Ang-2) [8], хемокины и цитокины (фактор некроза опухоли α , TNF- α) [9], ферменты (матриксная

металлопротеиназа 12, MMP-12) [10], выполняющие роль метаболических регуляторов и обеспечивающие миграцию, инвазию, ангиогенез и модуляцию динамического взаимодействия всех звеньев канцерогенеза. Большая роль в опухолевой прогрессии и формировании лекарственной резистентности также отводится онкобелкам и гликопротеинам (bcl-2, Fas/APO (CD95), p53) [11]; изменение их экспрессии может способствовать снижению эффективности иммунного надзора и препятствовать апоптотической гибели опухолевых клеток.

Роль указанных маркеров при РМЖ исследуется давно, однако опубликованные результаты фрагментарны, о механизмах развития лекарственной резистентности нет единого мнения. При этом в случае определения молекулярно-генетических характеристик опухолевого микроокружения наиболее оправданными и информативными становятся многопараметрические иммуногистохимические (ИГХ) методы, которые позволяют определить взаиморасположение популяций клеток, что является важным фактором изучения межклеточных взаимодействий в канцерогенезе. Таким образом, комплексная детекция целевых биомаркеров опухоли и ее микроокружения может открыть новые терапевтические точки приложения и предложить новые тактические подходы для увеличения периода ремиссии и долгосрочной выживаемости пациенток с РМЖ [12].

Цель исследования — изучить молекулярно-генетические характеристики опухолевого микроокружения и механизмы клеточной гибели при резистентном местно-распространенном РМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 48 пациенток с РМЖ T2–4N0–3M0–1 (средний возраст $55,6 \pm 9,8$ года) и 29 пациенток сопоставимого возраста с фиброаденомой, наблюдавшихся с 2020 по 2023 г. в Крымском республиканском онкологическом клиническом диспансере им. В.М. Ефетова. Согласно дизайну работы больные разделены на группы: в 1-ю группу вошли женщины с РМЖ, резистентным к неоадьювантной химиотерапии (НХТ) ($n = 23$), во 2-ю – с РМЖ и полным ответом на НХТ ($n = 25$), в контрольную – с фиброаденомой ($n = 29$). Обследование пациенток до начала терапии было стандартным. Использовали визуализирующие методы исследования структуры молочной железы (маммографию, ультразвуковое исследование, эластографию, маммолимфосцинтиграфию) и морфологическую верификацию изменений на тканевом уровне при микроскопии трепанобиоптатов с последующим ИГХ-анализом данных образцов.

В неоадьювантном режиме пациенткам проводили химиотерапию по схеме FAC (5-фторурацил в дозе 500 мг/м^2 , доксорубин в дозе 50 мг/м^2 , циклофосфамид в дозе 500 мг/м^2). После НХТ выполняли операцию в объеме радикальной мастэктомии, радикальной резекции или секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией. Эффективность НХТ оценивали по результатам клинических, инструментальных и морфологических исследований, согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения.

Исследования проводили в Центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинского института им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Изучали фрагменты тканей первичного очага опухоли, полученные на разных этапах лечения. Кусочки ткани после фиксации, обезвоживания и стандартной проводки заливали в парафиновые блоки согласно инструкциям производителя рекомендованного гистологического

оборудования фирмы Leica (Германия). Мы изучили с помощью ИГХ-метода экспрессию следующих опухолю-инфильтрирующих иммунных клеток: CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, CD20+ В-лимфоцитов и CD68+ макрофагов. Также исследовали экспрессию цитокина TNF- α , VEGF-A и Ang-2, MMP-12, маркера гипоксии индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), факторов онкогенеза и апоптоза (bcl-2, p53, CD95).

Иммуногистохимический анализ выполнен с использованием стейнера Bond-MAX (Leica Biosystems Melbourne Pty Ltd., Австралия). Парафиновые срезы толщиной 4 мкм помещали на высокоадгезивные стекла и окрашивали по протоколу, соответствующему каждому антителу (CD4 (clone 4B12, Leica, Великобритания), CD8 (clone YN00246m, Elabscience, США; разведение 1:200), CD20 (clone L26, Leica, Великобритания; разведение 1:100), CD68 (clone 125212, Abcam, США; разведение 1:100), TNF- α (clone 220210, Abcam, США; разведение 1:100), VEGF A (clone RB-9031-P1, Thermo Scientific, Великобритания; разведение 1:100), Ang-2 (clone 8452, Abcam, США; разведение 1:100), MMP-12 (clone 137443, Abcam, США; разведение 1:500), iNOS (clone 230456, Abcam, США; разведение 1:100), bcl-2 (clone BCL-2/100/D5, Leica, Великобритания; разведение 1:100), p53 (clone DO-7, Leica, Великобритания; разведение 1:200), CD95 (clone 13/Fas, BD Biosciences, США; разведение 1:100)), с системой визуализации Bond Polymer Refine Detection Systems (Leica Biosystems, Великобритания). Протокол реакции включал этапы депарафинизации, высокотемпературной демаскировки в буферном растворе, подавления эндогенной пероксидазы перекисью водорода, инкубации с первичным, вторичным и третичным антителами, меченным полимером, и окрашивания ядер гематоксилином (табл. 1). Использованы протоколы постановки реакции, рекомендованные производителями соответствующих клонов антител.

Таблица 1. Характеристика антител и особенности протоколов реакции

Table 1. Characteristics of antibodies and features of reaction protocols

Антитело Antibody	Клон Clon	Производитель Manufacturer	Разведение Dilution	Демаскировка, pH (мин) Retrieval, pH (min)	Инкубация, мин Incubation, min
CD4	4B12	Leica, Великобритания	—	6,0 (20)	15
CD8	YN00246m	Elabscience, США	1:200	9,0 (20)	15
CD20	L26	Leica, Великобритания	1:100	9,0 (20)	15
CD68	125212	Abcam, США	1:100	9,0 (20)	15
TNF- α	220210	Abcam, США	1:100	6,0 (30)	15
VEGF A	RB-9031-P1	Thermo Scientific, Великобритания	1:100	6,0 (30)	15
Ang-2	8452	Abcam, США	1:100	6,0 (20)	15
MMP12	137443	Abcam, США	1:500	6,0 (30)	15

Окончание табл. 1
End of table 1

Антитело Antibody	Клон Clon	Производитель Manufacturer	Разведение Dilution	Демаскировка, pH (мин) Retrieval, pH (min)	Инкубация, мин Incubation, min
iNOS	230456	Abcam, США	1:100	6,0 (30)	15
bcl-2	BCL-2/100/D5	Leica, Великобритания	1:100	6,0 (30)	15
P53	DO-7	Leica, Великобритания	1:200	6,0 (20)	15
CD95	13/Fas	BD Biosciences, США	1:100	6,0 (20)	15

Примечание. *TNF-α* – фактор некроза опухоли α; *VEGF A* – фактор роста эндотелия сосудов A; *MMP-12* – металлопротеиназа 12; *iNOS* – индуцибельная синтаза оксида азота.
Note. *TNF-α* – tumor necrosis factor α; *VEGF A* – vascular endothelial growth factor A; *MMP-12* – metalloproteinase 12; *iNOS* – inducible nitric oxide synthase.

Препараты заключали под покровное стекло и просматривали под микроскопом Leica DM2000 (Leica Microsystems, Германия). Интенсивность окрашивания оценивали не менее чем в 10 полях зрения в каждом случае. Для маркеров дифференцировки лимфоцитов, а также bcl-2, p53 и iNOS подсчитывали абсолютное число положительно окрашенных клеток в поле зрения, для TNF-α, VEGF A, Ang-2, MMP12 и CD95 – процент окрашенных клеток в поле зрения и интенсивность окрашивания по 4-балльной шкале от 0 до 3 (0 баллов – отсутствие окрашивания, 1 балл – окрашивание слабой интенсивности, 2 балла – окрашивание средней интенсивности, 3 балла – интенсивное окрашивание), а также абсолютное количество положительно окрашенных клеток.

Статистический анализ выполнен с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Нормальное распределение ввиду малой выборки оценивали по критериям Шапиро–Уилка. Сравнительный анализ выполнен с использованием точного теста Фишера. Взаимосвязь между показателями оценивали методом ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общая характеристика больных РМЖ представлена в табл. 2.

При проведении ИГХ-исследования образцов ткани молочной железы пациенток трех обследуемых групп выявлены особенности параметров иммунитета

Таблица 2. Общая характеристика пациенток с раком молочной железы, абс. (%)
Table 2. General characteristics of patients with breast cancer, abs. (%)

Параметр Parameter	Группа 1 (n = 23) Group 1 (n = 23)	Группа 2 (n = 25) Group (n = 25)
Размер опухоли (T): Tumor size (T):		
T1	2 (8,7)	5 (20,0)
T2	18 (78,3)	11 (44,0)
T3	1 (4,3)	4 (16,0)
Tx	2 (8,7)	5 (20,0)
Наличие регионарных метастазов (N): Presence of regional metastases (N):		
N0	6 (26,1)	5 (20,0)
N1	9 (39,1)	10 (40,0)
N2	7 (30,4)	8 (32,0)
N3	1 (4,4)	2 (8,0)
Стадия заболевания: Disease stage:		
IIA	8 (34,8)	5 (20,0)
IIB	7 (30,4)	9 (36,0)
IIIA	7 (30,4)	9 (36,0)
IIIC	1 (4,4)	2 (8,0)

Окончание табл. 2
End of table 2

Параметр Parameter	Группа 1 (n = 23) Group 1 (n = 23)	Группа 2 (n = 25) Group (n = 25)
Степень злокачественности (G): Grade of malignancy (G): G ₂ G ₃	3 (13,0) 20 (87,0)	7 (28,0) 18 (72,0)
Экспрессия рецептора эстрогена α (ERα): Expression of estrogen receptor (ERα): ERα+ ERα–	6 (26,1) 17 (73,9)	6 (24,0) 19 (76,0)
Экспрессия рецепторов прогестерона (PR): Expression of progesterone receptors (PR): PR+ PR–	5 (21,7) 18 (78,3)	9 (36,0) 16 (64,0)
Экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2): Expression of human epidermal growth factor 2 receptors (HER2): HER2+ HER2–	6 (26,1) 17 (73,9)	6 (24,0) 19 (76,0)

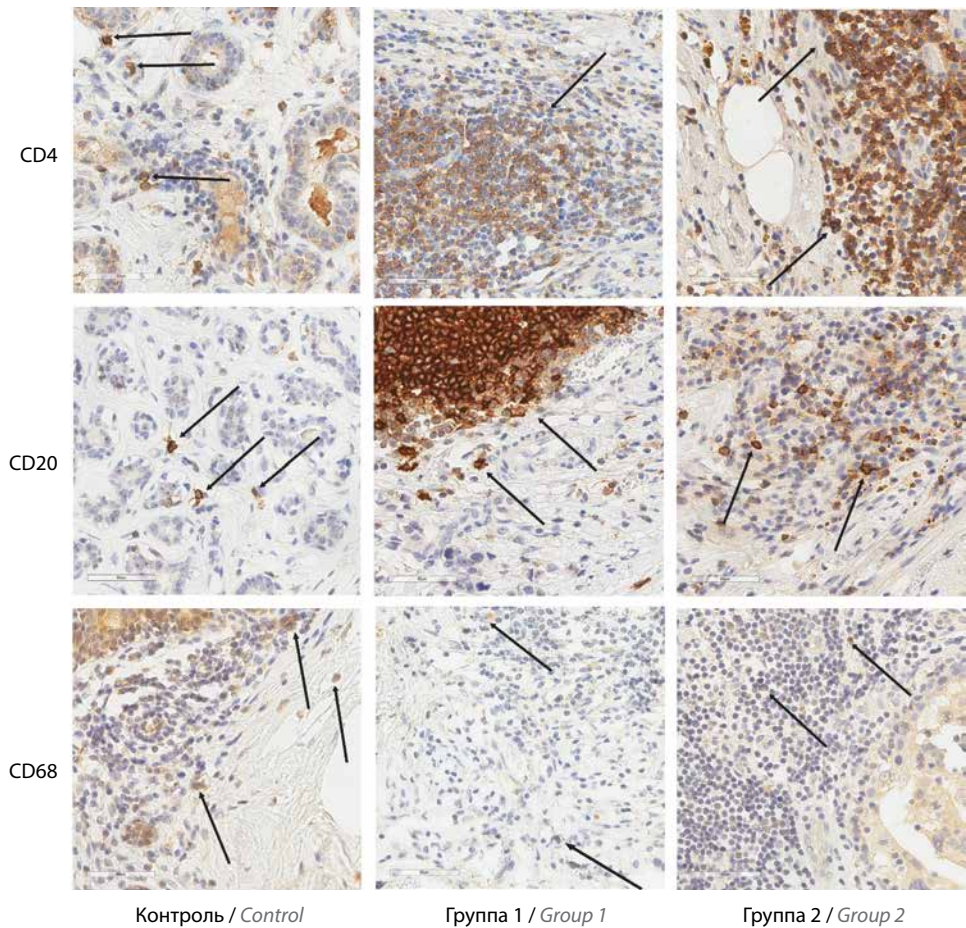


Рис. 1. Экспрессия маркеров дифференцировки лимфоцитов в контрольной и экспериментальных группах. Стрелками указаны положительно окрашенные клетки
Fig. 1. Expression of lymphocyte differentiation markers in the control and experimental groups. The arrows indicate positively stained cells

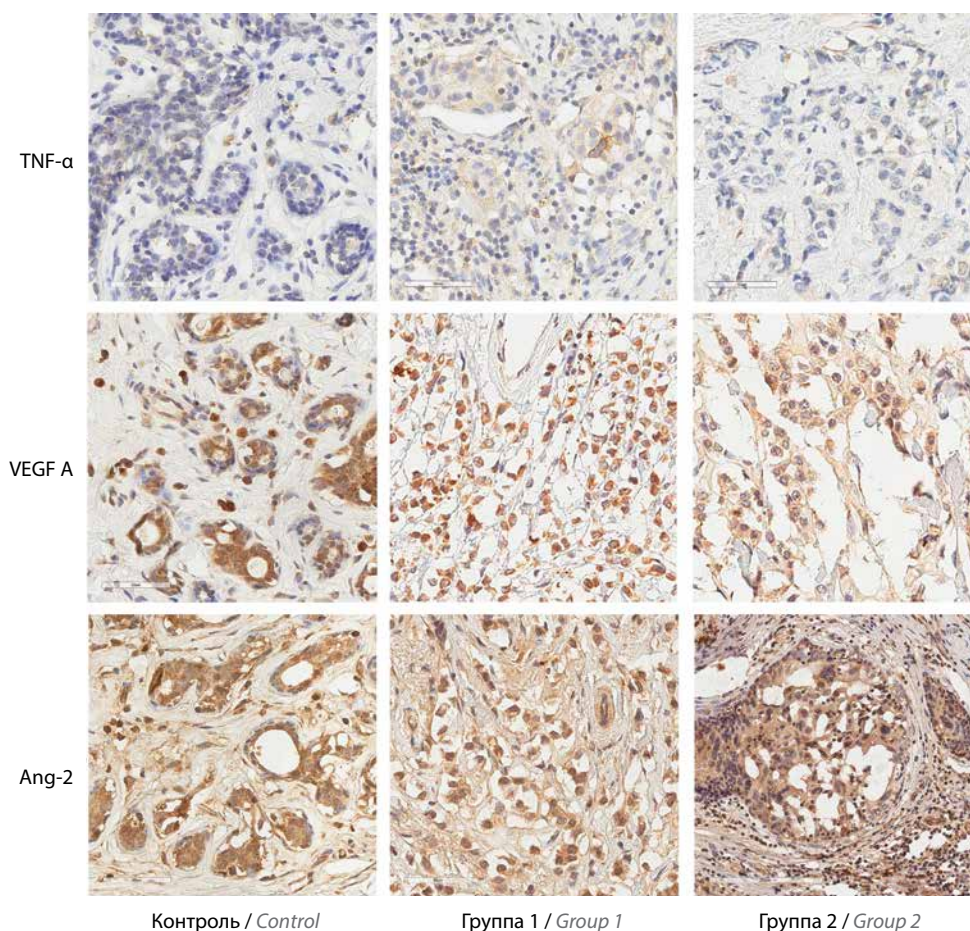


Рис. 2. Экспрессия маркеров ангиогенеза и фактора некроза опухоли α в ткани молочной железы женщин контрольной и экспериментальных групп. Стрелками указаны положительно окрашенные клетки. *TNF- α — фактор некроза опухоли α ; VEGF A — фактор роста эндотелия сосудов A*
Fig. 2. Expression of angiogenesis markers and tumor necrosis factor α in breast tissue of women from the control and experimental groups. The arrows indicate positively stained cells. *TNF- α — tumor necrosis factor α ; VEGF A — vascular endothelial growth factor A*

в зависимости от степени ответа на НХТ. Количество неактивированных В-лимфоцитов (CD20+) в группе контроля редко превышало 5 клеток в поле зрения. Для пациенток 1-й и 2-й групп установлена следующая зависимость: в строме опухоли популяция В-лимфоцитов малочисленна, в то время как в зоне демаркации, в лимфоидных скоплениях количество CD20+-клеток превышало контрольные значения, достигая максимума в группе резистентных форм РМЖ (рис. 1). Т-хелперы (CD4+) образовывали скопления в лимфоидных узелках, сформированных в демаркационной зоне больных 1-й и 2-й групп. Представленность CD4+ в строме опухоли экспериментальных групп не имела значимых различий и соответствовала показателям пациенток контрольной группы (см. рис. 1). Отмечено также достоверное снижение уровня Т-киллеров (CD8+) как в строме опухоли, так и в демаркационной зоне в 1-й группе по сравнению со 2-й ($p = 0,001$) и контрольной ($p = 0,032$) группами. Наиболее распространенными во всех группах оказались клетки макрофагальной линии, идентифицируемые в ходе ИГХ-анализа с помощью антител к CD68+. В группе контроля

их количество в среднем составило 5 (4–6) клеток в поле зрения (см. рис. 1). В 1-й и 2-й группах в участках зоны демаркации и условно здоровой ткани за границами опухоли количество макрофагов было значительно меньше. При этом макрофагальная популяция оказалась больше во 2-й группе по сравнению с 1-й группой ($p = 0,027$).

Интенсивность экспрессии TNF- α различалась в зависимости от группы и исследуемого участка ткани. В ткани пациенток контрольной группы TNF- α -положительными в среднем оказались 10 % клеток стромы и 30 % железистых клеток (рис. 2). Во 2-й группе (у пациенток с полным ответом на НХТ) уровень экспрессии TNF- α в стромальных клетках (макрофагах, эндотелиоцитах, адипоцитах) не отличался от этого показателя в группе контроля. В 1-й же группе (у больных с резистентными формами РМЖ) уровень экспрессии этого биомаркера в образцах ткани был достоверно выше по сравнению со 2-й ($p > 0,001$) и контрольной ($p = 0,01$) группами.

В отношении сосудистых факторов получены следующие данные: эпителий молочной железы в ткани

пациенток с фиброаденомой характеризуется высоким уровнем экспрессии VEGF A и Ang-2 (см. рис. 2). В строме насчитывается в среднем 22 (16–28) VEGF A+-клетки в поле зрения, 1/4 из которых составляют эндотелиоциты кровеносных сосудов. Несколько выше экспрессия Ang-2 в строме молочной железы – 39 (26–42) клеток в поле зрения. В группах пациенток с РМЖ интенсивность экспрессии в опухолевых и в здоровых клетках снижается как по яркости окрашивания, так и по числу окрашенных клеток. Также в строме опухолевой и условно здоровой ткани достоверно уменьшалось количество VEGF A+-клеток. Экспрессия Ang-2 в резистентной ткани пациенток экспериментальных групп была значительно повышена как в эндотелиоцитах, так и в опухолевой строме по сравнению с этим показателем в здоровой ткани.

При оценке уровня MMP-12 в здоровом эпителии выявлена его экспрессия средней интенсивности более чем в 60 % клеток. В группе полного ответа на терапию наблюдалась тенденция к снижению интенсивности экспрессии, а резистентный РМЖ, наоборот, экспрессировал MMP-12 сильнее, однако различия не были

статистически значимыми. Количество здоровых клеток, экспрессирующих iNOS, составило в среднем 6 (5–7) эпителиоцитов в поле зрения (рис. 3). В строме количество iNOS-положительных клеток оказалось в 2 раза ниже. В 1-й и 2-й группах их количество в строме и эпителии оказалось значительно меньше, независимо от лечения ($p = 0,029$ и $p = 0,040$ соответственно). Экспрессия апоптотического маркера FAS в эпителии и строме здоровой и опухолевой тканей не имела значимых различий. В единичных случаях у пациенток с РМЖ, резистентным к НХТ, наблюдалось снижение экспрессии данного маркера. Антиапоптотический фактор bcl-2 экспрессировался в большинстве эпителиоцитов ткани группы контроля (в среднем 410 (324–516) клеток в поле зрения), а также в клетках стромы (50 (40–66) клеток в поле зрения). В 1-й и 2-й группах наблюдалось статистически значимое снижение экспрессии bcl-2 как в эпителии, так и в строме опухоли и условно здоровой ткани (см. рис. 3). При этом в 1-й группе данная особенность оказалась более выраженной по сравнению со 2-й группой ($p = 0,001$). Антионкогенный p53 умеренно экспрессировался в ядрах нормальных эпителиоцитов (25 (21–37) клеток в поле

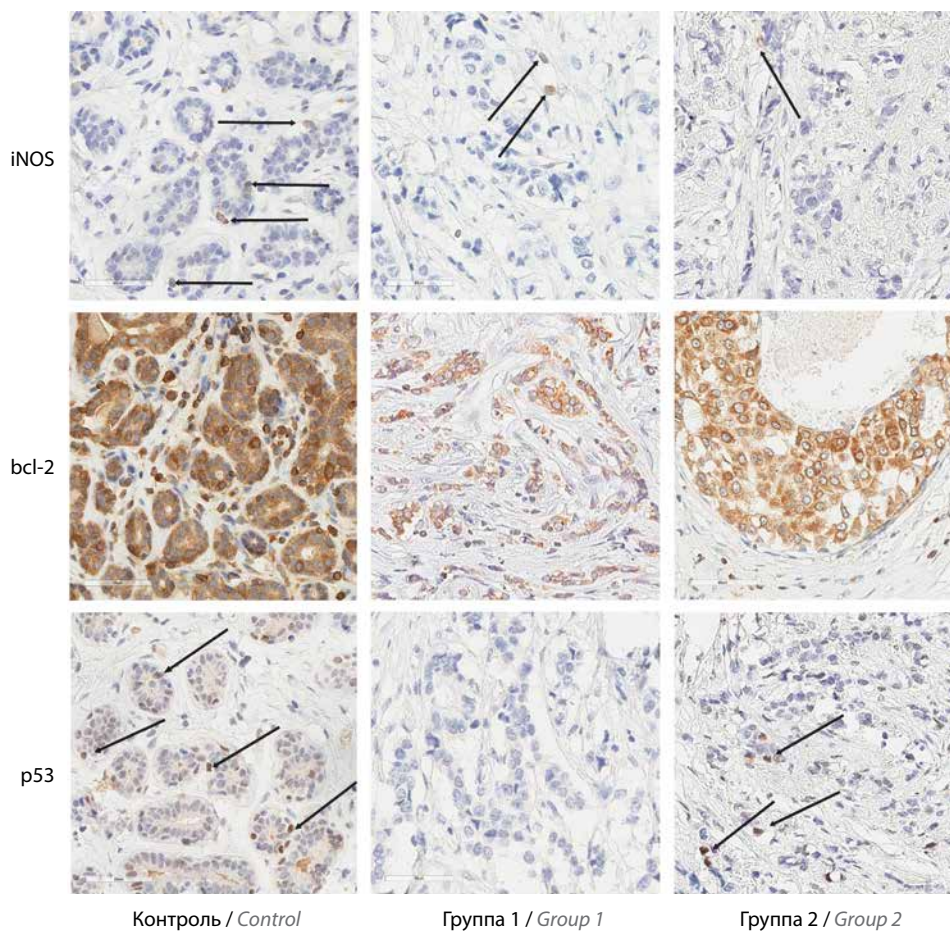


Рис. 3. Экспрессия индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), bcl-2 и p53 в ткани опухоли молочной железы и в контрольной группе. Стрелками указаны положительно окрашенные клетки

Fig. 3. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), bcl-2 and p53 markers in breast tumor tissue and in the control group. The arrows indicate positively stained cells

зрения) и отсутствовал в клетках стромы. В опухолевой ткани уровень экспрессии p53 снижался, особенно при резистентных формах РМЖ по сравнению с РМЖ с полным ответом на НХТ ($p = 0,02$). При этом в участках условно здоровой ткани в группах с ответом на НХТ и резистентных к ней p53 детектировался только в эпителиоцитах и также статистически значимо меньше, чем в ткани контрольной группы ($p = 0,004$).

В ходе корреляционного анализа выявлены значимые связи различной силы и направленности между экспрессией маркеров. Так, CD4+ и CD8+-клетки в ткани опухоли РМЖ характеризовались положительными корреляционными взаимосвязями с маркерами MMP-12 ($r = 0,510$), iNOS ($r = 0,493$), p53 ($r = 0,656$), bcl-2 ($r = 0,590$) и VEGF A ($r = 0,457$). Экспрессия VEGF A в строме опухоли и здоровой ткани имела положительные связи с уровнями MMP-12 ($r = 0,680$ и $r = 0,558$ соответственно) и TNF- α ($r = 0,491$ и $r = 0,579$ соответственно). Аналогичная ассоциация выявлена для TNF- α и Ang-2 ($r = 0,497$ и $r = 0,619$ соответственно). Повышение интенсивности экспрессии FAS в строме условно здоровой ткани опухолевых образцов имело обратные корреляционные связи с Ang-2 ($r = -0,539$), MMP12 ($r = -0,523$), TNF- α ($r = -0,493$) и iNOS ($r = -0,563$). При этом экспрессия iNOS, VEGF A, Ang-2, MMP-12 и TNF- α в опухолевой ткани была положительно связана с количеством FAS+-клеток и интенсивностью экспрессии этого белка в эпителии опухоли. Ang-2 и MMP-12 в строме опухоли ассоциированы с экспрессией p53 в опухолевых клетках ($r = 0,512$ и $r = 0,503$ соответственно). Аналогичная ассоциация экспрессии p53 и TNF- α ($r = 0,510$) и MMP-12 ($r = 0,672$) отмечена в контрольных образцах. Антиапоптотический белок bcl-2 в строме ткани железы имел связь с Ang-2 ($r = 0,714$), MMP-12 ($r = 0,742$) и TNF- α ($r = 0,663$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В современной литературе содержится много данных о взаимосвязи механизмов лекарственной резистентности и aberrантной активации ростовых факторов, цитокинов, ферментов, дерегуляцией экспрессии их рецепторов, сигнальных каскадов, мутациями в онкогенах и генах-супрессорах опухолей [5]. Мы изучили молекулярно-генетические характеристики опухолевого микроокружения и механизмы клеточной гибели при резистентном РМЖ. Полученные данные позволили выделить как минимум 2 значимых звена в процессе формирования лекарственной устойчивости опухоли.

Первый механизм, вероятно, связан с подавлением иммунного ответа и формированием провоспалительного профиля микроокружения опухоли. Мы выявили, что отсутствие ответа на НХТ сопряжено со смещением соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4+/CD8+) в сторону снижения цитотоксических CD8+-клеток и повышения экспрессии TNF- α .

Т-клеточный иммунитет является одним из компонентов противоопухолевой защиты [13], дефицит пула CD8+-клеток в ткани резистентных форм РМЖ говорит об уклонении опухоли от иммунного надзора. Схожие данные получены и другими авторами [14, 15], выявившими, что значительная инфильтрация лимфоцитами опухоли молочной железы связана с более высокой вероятностью полного ответа на НХТ, а для ткани железы после завершения курсов терапии характерно повышенное соотношение уровней экспрессии CD8+ и CD4+, а также рост гранзима В, стимулятора пироза и апоптоза клеток карциномы при РМЖ. Результаты исследования ИГХ-статуса тканей пациентов с РМЖ показали положительную зависимость эффективности терапии антрациклином и таксанами от наличия в опухолевом микроокружении опухолеинфильтрирующих лимфоцитов Foxp3+ и CD8+ [16]. Фактор некроза опухоли α также участвует в механизмах опухоль-супрессивных эффектов иммунных клеток. Такая стимуляция провоспалительного профиля микроокружения опухоли связана с модулированием иммунного ответа и необходимостью поддержания оптимального соотношения CD4+- и CD8+-клеток и является важной задачей повышения эффективности терапии РМЖ [17]. Большая роль в реализации иммунного противоопухолевого ответа принадлежит и опухолеассоциированным макрофагам. В ходе исследований тканей опухоли РМЖ трижды негативного иммунофенотипа не выявлено значимых корреляций CD68+ с общей и безрецидивной выживаемостью. При этом высокая плотность CD68+ в инвазивном РМЖ напрямую связана со снижением показателей общей выживаемости [18]. Эти данные свидетельствуют о вовлеченности CD68+ в супрессивный тип ответа. В нашем исследовании выраженность CD68+-инфильтрации опухоли у больных с резистентной формой РМЖ не отличалась от таковой у пациенток контрольной группы, тогда как у женщин с ответом на лечение она была существенно выше. В целом из-за высокой гетерогенности популяции CD68+-клеток их прогностическое значение при РМЖ не до конца ясно.

Второй механизм возникновения резистентности опухоли к химиотерапии, идентифицированный в нашем исследовании, проявляется в виде ухода клеток от апоптоза (повышение уровня bcl-2 и снижение уровня FAS) и блокировки ферментов клеточного метаболизма (p53).

Программируемая гибель опухолевых клеток может быть индуцирована по внешнему и внутреннему путям. Применяемые препараты могут действовать через рецептор-лигандную систему CD95 (Fas/APO-1) [19]. Взаимодействие Fas-лиганда с экстрацеллюлярным доменом Fas-рецептора, активируя каспазу 8 в опухолевой клетке, запускает механизм клеточной гибели по внешнему пути. Отсутствие экспрессии CD95-рецептора в клетках является еще одним механизмом ухода от иммунного надзора, приводящего к блокиро-

ванию апоптоза [20]. Цитотоксические препараты и лучевая терапия также могут способствовать активации внутреннего пути апоптоза, ассоциированного с каспазой 9 [21]. Наиболее изученными белками, участвующими в управлении данным процессом, являются продукты протоонкогена *bcl-2* и гена-супрессора опухолевого роста *p53*. Продemonстрировано, что повышенная экспрессия *bcl-2* зачастую связана с люминальными типами РМЖ, а его ингибирование повышает эффективность химиотерапевтических агентов [22–24]. В ходе нашего исследования мы не выявили статистических корреляций и различий между группами в зависимости от рецепторного статуса ER- α /PR (PR — рецептор прогестерона), однако, по нашему мнению, это перспективное направление дальнейшей работы при существенном увеличении выборки.

Белок *p53* также играет большую роль в регуляции опухолевого ландшафта; его дисфункция может быть еще одной причиной гиперэкспрессии TNF- α у пациенток с резистентным к НХТ РМЖ [25]. Важно учесть, что мы не изучали мутации гена *p53*, но данный фактор, несомненно, влияет на способ ответа опухоли на НХТ. Результаты нашего исследования демонстрируют преимущественно отрицательный ИГХ-статус экспрессии данного белка в опухолевой ткани пациенток с отсутствием эффекта от НХТ и положительный ИГХ-статус у больных с адекватным лечебным патоморфозом.

Важно отметить также различную динамику сосудистых факторов: для VEGF A, не зависящего от ответа опухоли на терапию, характерно снижение активности вследствие ее эффекта, а для Ang-2 — уменьшение экспрессии в резистентных очагах. Таким образом, в чувствительном к терапии очаге уровень экспрессии Ang-2 больше, чем VEGF A, а в резистентном — наоборот,

что подтверждается результатами работ других исследователей онкоангиопоэза [26].

В целом наблюдается закономерность в ослаблении выявленных взаимосвязей между экспрессией различных маркеров в опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой. Обращает на себя внимание снижение числа связей (их потеря). В отдельных случаях (с FAS-рецептором) наблюдается инверсия ассоциации: в неопухолевой ткани она отрицательная (обратная), а в опухоли становится положительной (прямой). Выявлено наибольшее количество связей с маркерами сосудистого роста, отвечающими за метаболизм клетки (*p53*, iNOS) и структуру ткани (MMP-12, TNF- α), что может свидетельствовать о дисбалансе в сигнальных взаимодействиях внутри опухолевой ткани и с ее микроокружением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лекарственная резистентность при РМЖ обусловлена многими факторами: 1) истощением пула эффекторных противоопухолевых клеточных популяций, в частности Т-цитотоксических клеток; 2) формированием вокруг опухоли провоспалительной микросреды посредством «манипулирования» цитокинами; 3) нарушением программ гибели опухолевых клеток; 4) активацией пути ангиогенеза, зависящего от Ang-2. Полученные результаты могут служить основой для создания диагностических алгоритмов, обладающих предиктивной значимостью в отношении эффективности НХТ, а также в будущем помочь идентифицировать мишени для новых методов комбинированного лечения РМЖ, например с иммунотерапией, применением промоторов внутреннего пути активации апоптоза, ингибиторов Ang-2-зависимого ангиогенеза.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2019 г. (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020. 252 с. Malignant tumors in Russia in 2019 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shahzadova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena — filial FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii, 2020. 252 p. (In Russ.).
2. Siegel R.L., Miller K.D., Wagle N.S., Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023;73(1):17–48. DOI: 10.3322/caac.21763
3. Carioli G., Malvezzi M., Rodriguez T. et al. Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe. *Breast* 2017;36:89–95. DOI: 10.1016/j.breast.2017.06.003
4. Caswell-Jin J.L., Lorenz C., Curtis C. Molecular heterogeneity and evolution in breast cancer. *Ann Rev Cancer Biol* 2021;5(1):79–94. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-060220-014137
5. Зяблицкая Е.Ю., Кубышкин А.В., Сорокина Л.Е. и др. 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
6. Zyblytskaya E.Yu., Kubyshekin A.V., Sorokina L.E. et al. Cellular microenvironment as an object of targeted therapy for malignant neoplasms. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):8–20. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-4-8-20
7. Badr N.M., McMurray J.L., Danial I. et al. Characterization of the immune microenvironment in inflammatory breast cancer using multiplex immunofluorescence. *Pathobiology* 2023;90(1):31–43. DOI: 10.1159/000524549
8. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Кривошеева Л.В. и др. Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов оксида азота при росте опухолей различного гистогенеза. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(3):73–80. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80
9. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Krivosheeva L.V. et al. iNOS expression and biosynthesis of nitric oxide metabolites in the course of tumor growth of different histogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(3):73–80. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80
10. Danza K., Pilato B., Lacalamita R. et al. Angiogenetic axis angiotensins/Tie2 and VEGF in familial breast cancer. *Eur J Hum Genet* 2013;21(8):824–30. DOI: 10.1038/ejhg.2012.273

9. Laha D., Grant R., Mishra P., Nilubol N. The role of tumor necrosis factor in manipulating the immunological response of tumor microenvironment. *Front Immunol* 2021;12:656908. DOI: 10.3389/fimmu.2021.656908
10. Kwon M.J. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in breast cancer. *Front Oncol* 2023;12:1108695. DOI: 10.3389/fonc.2022.1108695
11. Williams M.M., Cook R.S. Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? *Oncotarget* 2015;6(6):3519–30. DOI: 10.18632/oncotarget.2792
12. Galván Morales M.A., Barrera Rodríguez R., Santiago Cruz J.R., Teran L.M. Overview of new treatments with immunotherapy for breast cancer and a proposal of a combination therapy. *Molecules* 2020;25(23):5686. DOI: 10.3390/molecules25235686
13. Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget* 2017;8(4):7175–80. DOI: 10.18632/oncotarget.12739
14. Denkert C., Loibl S., Noske A. et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(1):105–13. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.7370
15. Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011;331(6024):1565–70. DOI: 10.1126/science.1203486
16. West N.R., Milne K., Truong P.T. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011;13(6):R126. DOI: 10.1186/bcr3072
17. Seo A.N., Lee H.J., Kim E.J. et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer* 2013;109(10):2705–13. DOI: 10.1038/bjc.2013.634
18. Jamiyan T., Kuroda H., Yamaguchi R. et al. CD68- and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple-negative cancer of the breast. *Virch Arch* 2020;477(6):767–75. DOI: 10.1007/s00428-020-02855-z
19. Соколовская А.А., Заботина Т.Н., Палкина Т.Н., Блохин Д.Ю. Возможное участие CD95(Apo-1/Fas)/CD95L в лекарственно-индуцированном апоптозе. *Российский биотерапевтический журнал* 2004;3(3):6–11. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Palkina T.N., Blokhin D.Yu. Possible involvement of CD95(Apo-1/Fas)/CD95L in drug-induced apoptosis. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2004;3(3):6–11. (In Russ.).
20. Müschen M., Moers C., Warskulat U. et al. CD95 ligand expression as a mechanism of immune escape in breast cancer. *Immunology* 2000;99(1):69–77. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2000.00921.x
21. Стукань А.И., Горяинова А.Ю., Чухрай О.Ю. и др. Иммунное опухолевое микроокружение и маркеры апоптоза при раке молочной железы у носительниц наследственных мутаций в гене *BRCA1*. Опухоли женской репродуктивной системы 2022;18(2):29–39. DOI: 10.17650/1994-4098-2022-18-2-29-39 Stukan A.I., Goryainova A.Yu., Chukhray O.Yu. et al. Tumor immune microenvironment and apoptotic markers in breast cancer patients carrying *BRCA1* gene mutations. *Opuholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of Female Reproductive System* 2022;18(2):29–39. (In Russ.). DOI: 10.17650/1994-4098-2022-18-2-29-39
22. Dawson S.J., Makretsov N., Blows F.M. et al. BCL2 in breast cancer: a favorable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer* 2010;103(5):668–75.
23. Honma N., Horii R., Ito Y. et al. Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. *BMC Cancer* 2015;15:698. DOI: 10.1186/s12885-015-1686-y
24. Nguyen C.V., Nguyen Q.T., Vu H.T. Combined p53 and Bcl-2 immunophenotypes in the prognosis of Vietnamese invasive breast carcinoma: a single institutional retrospective analysis. *Technol Cancer Res Treat* 2020;19:1533033820983081. DOI: 10.1177/1533033820983081
25. Blagih J., Buck M.D., Vousden K.H. p53, cancer and the immune response. *J Cell Sci* 2020;133(5):jcs.237453. DOI: 10.1242/jcs.237453
26. Chen H.H., Weng B.Q., Cheng K.J. et al. Effect of the vascular endothelial growth factor expression level on angiopoietin-2-mediated nasopharyngeal carcinoma growth. *Vasc Cell* 2014;6(1):4. DOI: 10.1186/2045-824X-6-4

Вклад авторов

К.А. Алиев: сбор биологического материала, формирование базы данных;
 Е.Ю. Зяблицкая: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование;
 Т.П. Макалиш: выполнение морфологического исследования;
 Л.Е. Сорокина: написание текста статьи;
 Э.Р. Асанова: выполнение микрофотосъемки и статистическая обработка данных.

Authors' contributions

K.A. Aliyev: collection of biological material, database formation;
 E.Yu. Zyablitskaya: development of the concept and design of research, article editing;
 T.P. Makalish: performing morphological research;
 L.E. Sorokina: article writing;
 E.R. Asanova: microphotography and statistical data processing.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.А. Алиев / K.A. Aliyev: <https://orcid.org/0000-0003-3911-1245>
 Е.Ю. Зяблицкая / E.Yu. Zyablitskaya: <https://orcid.org/0000-0001-8216-4196>
 Т.П. Макалиш / T.P. Makalish: <https://orcid.org/0000-0003-1884-2620>
 Л.Е. Сорокина / L.E. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-1862-6816>
 Э.Р. Асанова / E.R. Asanova: <https://orcid.org/0009-0001-0409-3297>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (государственное задание № FZEG-2023-0009 «Изучение гетерогенности микроокружения опухоли как фактора ее агрессивности и резистентности к терапии»).

Funding. The study was financially supported by the Ministry of Education and Science of Russia (State Assignment No FZEG-2023-0009 “Study of the heterogeneity of the tumor microenvironment as a factor in its aggressiveness and resistance to therapy”).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование одобрено университетским комитетом по биомедицинской этике (протокол № 7 от 23.06.2023).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was approved by the University Committee on Biomedical Ethics (Protocol No. 7 dated 06/23/2023).

All patients signed an informed consent to participate in the study.