

*Л.М. Берштейн¹, А.О. Иванцов¹, А.Г. Иевлева¹, А.Р. Венина¹,
И.В. Берлев^{1,2}*

Рецепторный фенотип, экспрессия HER-2/neu, PD-1, PD-L1 и лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация карцином эндометрия: сравнение современных молекулярно-биологических типов заболевания (роль индекса массы тела)

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» МЗ РФ,

²Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

Цель настоящего сообщения состояла в том, чтобы оценить рецепторный статус опухолей при молекулярно-биологических типах рака эндометрия (РЭ), подразделенных в соответствии с современной классификацией, и их заселение клетками лимфоцитарного и макрофагального ряда, принимая во внимание индекс массы тела пациенток.

Материалы и методы: К работе привлекался материал от нелеченых больных РЭ (n=229), число которых варьировало в зависимости от использованного метода. Средний возраст больных был близок 60 годам, и порядка 90% их находились в постменопаузе. Результаты работы оказалось возможным разделить на две основные подгруппы: в зависимости от молекулярно-биологического типа опухоли (определявшегося на основе генетического и иммуногистохимического анализа) и б) в зависимости от величины индекса массы тела (ИМТ), что было оценено у больных при типе РЭ с признаками дефекта репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR-D) и с типом без характерного молекулярного профиля (WCMР), но не делалось (из-за меньшего числа пациенток) при типах РЭ с мутацией гена POLE или с экспрессией онкобелка p53. По полученным данным, при сравнении отдельных типов РЭ наименьшие значения ER и PR по Allred выявились при типах POLE и p53, а «трижды негативный» вариант опухоли (ER-,PR-,HER2/neu-) был наиболее част при типах POLE (45.5% случаев) и WCMР (19.3%). Для p53+ типа РЭ характерна высокая экспрессия макрофагального маркера CD68 и лимфоцитарного Foxp3, а также мРНК PD-1 и SALL4. Типу WCMР, помимо отмеченного, свойственно снижение экспрессии лимфоцитарных маркеров CD8 (на уровне белка) и PD-L1 (на уровне мРНК). При учете величины ИМТ его значение >30.0 (характерное для ожирения) сочеталось с тенденцией к повышению

экспрессии HER-2/neu в случае типа MMR-D и к снижению HER-2/neu, FOXP3 и ER при типе WCMР.

Выводы: Накопленные сведения (характеризующие здесь, преимущественно, гормоночувствительность опухоли и ее лимфоцитарно-макрофагальную инфильтрацию) дополнительно подтверждают делавшееся нами ранее заключение о том, что различия между заболевшими РЭ женщинами определяются как принадлежностью новообразования к тому или иному молекулярно-биологическому типу (выделяемому по современной классификации), так и особенностями массы тела и, весьма вероятно, ассоциированными с ними гормонально-метаболическими характеристиками.

Ключевые слова: рак эндометрия, молекулярно-биологические типы, опухолевая ткань, рецепторный фенотип, макрофагальная и лимфоцитарная инфильтрация, иммуногенность, мутационная нагрузка

Введение

Постепенное, хотя и не повсеместное, введение в практику одного из основных вариантов современной классификации молекулярно-биологических типов рака эндометрия (РЭ), или т.н. PROMiSE classification [1], выявило необходимость дополнительно характеризовать эти типы с точки зрения как особенностей заболевающих ими женщин, так и самой опухолевой ткани. В наших предыдущих работах [2, 3, 4] были предприняты шаги в этом направлении применительно к эндокринологии заболевания и некоторым системным маркерам провоспалительно-прогенотоксической природы. Помимо этого, обращалось внимание [4] на не всегда достаточно проанализированные в сравнительном аспекте такие свойства карцином эндометрия, относимых к молекулярно-биологическим типам «нового поколения» [1], как (в особен-

ности) гормоночувствительность их ткани и — чаще изучавшееся [5, 6, 7, 8] — заселение ее клетками макрофагальной (прежде всего, CD68) и лимфоцитарной природы.

Клетки лимфоцитарного ряда имеют отношение к формированию иммунного ответа новообразования, что связано также с появлением в опухоли — в том числе, в связи с т.н. мутационной нагрузкой — новых антигенов, повышением иммуногенности опухолевой ткани, пластичностью ее микроокружения и вариабельностью течения опухолевого процесса [7, 8, 9, 10, 11] и, как одно из следствий, — с обсуждением вопроса о показаниях к использованию при РЭ и при каких именно его типах такого варианта иммунотерапии как применение блокаторов контрольных точек иммунного ответа [12, 13, 14]. Направление, основанное на анализе клеток лимфоцитарной природы, наряду с уже ставшим практически традиционным изучением представленности цитотоксических Т-лимфоцитов CD8(+), главной задачей которых является уничтожение поврежденных клеток собственного организма, а также регуляторных Т-лимфоцитов FoxP3(+), чья повышенная активность может сочетаться с ослаблением влияния иммунной системы на опухолевые клетки [15], с относительно недавнего времени дополнено при оценке лимфоцитарной инфильтрации опухоли определением таких маркеров как PD-1 и PD-L1. Эти белки являются, соответственно, рецептором запрограммированной клеточной гибели (PD-1) и лигандом этого рецептора (PDL-1), их взаимодействие играет существенную роль в ускользании опухолевых клеток от иммунного ответа [16], а сами PD-1 и PD-L1 — как контрольные точки последнего — служат важнейшей мишенью упоминавшегося выше современного подхода к иммунотерапии в онкологии, начало которому было положено более 10 лет тому назад (см [17]) и, как отмечалось выше, постепенно начинает находить применение при РЭ [13, 14].

В поддержании и обновлении гематопозитических стволовых клеток, которые предшествуют как миелоидным (в частности, моноцитам и макрофагам), так и лимфоидным клеткам (в том числе, Т-лимфоцитам как цитотоксического, так и регуляторного типа), важная роль принадлежит транскрипционному фактору SALL4 [18], экспрессии которого, по некоторым сведениям, приписывается также способность соответствовать в определенной степени и особенностям опухолевого процесса при раке эндометрия [19].

Цель настоящего сообщения с учетом изложенного выше состояла в том, чтобы оценить рецепторный статус опухолей при различных

типах РЭ и их заселение клетками лимфоцитарного и макрофагального ряда, принимая во внимание (там, где это было возможно) индекс массы тела пациенток, поскольку этот параметр является важной переменной, нередко сказывающейся на риске развития и характере течения карцином тела матки [4, 20].

Материалы и методы

К исследованию привлекался материал от нелеченых больных раком эндометрия (суммарно 229 человек), число которых варьировало в зависимости от использованного метода, представление о чем дают таблицы, приводимые в разделе «Результаты». Средний возраст больных был близок 60 годам, и свыше 85% пациенток находились в постменопаузе.

Распределение случаев РЭ по молекулярно-биологическим типам в соответствии с классификацией Talhouk et al. [1] базировалось на принципах, изложенных в предыдущих публикациях [2, 3, 4], и сводилось к анализу депарафинизированных блоков полученной в результате хирургического вмешательства ткани карцином эндометрия, что позволяло произвести поиск мутаций POLE (ДНК полимеразы эпсилон), оценить иммуногистохимически экспрессию онкобелка p53 и MMR(mismatch-repair)-белков /MLH1,MSH2, MSH6 и PMS2/ и отнести каждый конкретный случай к тому или иному молекулярно-биологическому типу новообразования. В соответствии с упомянутой классификацией выделяли 4 типа РЭ: с мутацией POLE, дефицитом MMR-белков (MMR-D), экспрессией p53 и без характерного молекулярного профиля, WCMP [1], а MMR-дефицитные случаи диагностировали, опираясь на рекомендации Stelloo et al. [21].

Помимо исследования экспрессии p53 и MMR-белков, иммуногистохимический метод применялся и для изучения представленности рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и рецепторов тирозинкиназы — эпидермального фактора роста 2 типа (HER-2/neu) в опухолевой ткани, а также выраженности макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации этой ткани на основе анализа маркера макрофагов (CD68) и клеток лимфоцитарного ряда (цитотоксических CD8 и регуляторных FoxP3); некоторые технические сведения об использованном в этой части работы ИГХ-методе представлены в табл. 1.

Таблица 1. Сведения о реагентах, применявшихся в ходе иммуногистохимического анализа, характеризующего рецепторный фенотип и макрофагально-лимфоцитарное заселение ткани рака эндометрия

Маркер	Первые антитела (компания, клон, разведение)	Вторые антитела (система для выявления)
ER	Ventana SP1, RTU	ultraView Universal DAB Detection Kit
PR	Ventana 1E2, RTU	ultraView Universal DAB Detection Kit
HER-2/neu	Ventana 4B5, RTU	ultraView Universal DAB Detection Kit
CD68 (макрофаг.)*	DAKO PG-M1 1:200	EnVision Flex Dako
Foxp3 (лимфоц.)*	Epitomics EP340, 1:50	EnVision Flex Dako
CD8 (лимфоц.)*	DAKO C8/1448 1:100	EnVision Flex Dako

Примечания: В случаях, отмеченных звездочкой (*), маркер анализировался в т.н. 'hot-spots'/'горячих полях» с использованием микроскопа Leica DM2500 и увеличением x200 (диаметр одного поля был равен при этом 1,05 мм); RTU — готовые к использованию

В целях анализа маркеров, характеризующих состояние контрольных точек иммунного ответа (PD-1, PD-L1), а также упоминавшегося во «Введении» транскрипционного фактора SALL4, связанного с функцией предшественников миелоидных и лимфоидных клеток [18] и, не исключено, с особенностями течения РЭ [19], оценивалась экспрессия мРНК (матричной РНК) генов, кодирующих эти три белка (поскольку иммуногистохимический анализ последних по техническим причинам оказался невозможен). Источником мРНК служили подвергнутые микродиссекции архивные патоморфологические образцы опухолевой ткани. Выделение мРНК и обратная транскрипция проводились по опубликованной ранее методике [22]. Экспрессия мРНК изучаемых генов определялась совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной онкологии при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на оборудовании CFX96 (BioRad Laboratories, США). Последовательности праймеров и флуоресцентных зондов представлены в таблице 2. Для анализа экспрессии генов PD-L1 и SALL4 мультиплексная ПЦР в режиме реального времени ставилась в объеме 20 мкл, где содержались 1 мкл раствора кДНК, 2,0 ед. акт. фермента ДНК-полимеразы ThermoStar, 1-кратный ПЦР-буфер, 2,5 мМ MgCl₂, по 200 мкМ каждого из нуклеотидтрифосфатов, по 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров гена-рефери SDHA, 0,3 мкМ TaqMan пробы SDHA-P, 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров и TaqMan-метки для соответствующего гена-мишени. При анализе экспрессии гена PD-1 применялась детекция с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green (0,2х); при этом для каждого образца ставились две реакции: первая — с праймерами, специфичными к гену-рефери (SDHA), и вторая — с праймерами, амплифицирующими фрагмент PD-1. Использовались следующие условия ПЦР-амплификации: денатурация в течение 20 сек при 95°C, отжиг и синтез в течение 1 мин при 60°C, 45 циклов.

Относительная экспрессия каждого гена в каждом образце рассчитывалась по формуле $2^{-\Delta C_t}$, где C_t — Cycle threshold (пороговый цикл), $\Delta C_t = C_t$ (ген-мишень) — C_t (ген-рефери, SDHA), причем, чем выше оказывалась итоговая цифра, тем большей была величина экспрессии.

Таблица 2. Последовательности праймеров и флуоресцентных зондов

Праймер/зонд	Последовательность олигонуклеотида	Размер ПЦР-продукта, п.о.
	SALL4	
SALL4ex2_F	TGGGAGCAAAGCAGAGAGC	
SALL4ex3_R	CCTTGACATAGGTCGGCG	101
SALL4ex2/3_P	FAM-GACTGCTCCGACCTTC-CATCT-BHQ	
	PD-L1	
PDL1_3/4F	TATGGTGGTGCCGACTACAA	
PDL1_4R	TGCTTGCCAGATGACTTCG	157
PDL1_P	FAM-TTACTGTGAAAGTCAAT-GCCCCAT-BHQ	
	PD1	
PD1_105F	GCGGCCAGGATGGTTCTTA	
PD1_105R	CAGGTGAAGGTGGCGTTGT	105
	SDHA (ген-рефери)	
SDHA_F	CCACTCGCTATTGCACACC	
SDHA_R	CACTCCCCGTTCTCCATCA	102
SDHA_P	R6G-ACGGTCTCTGCGATAT-GATACCA-BHQ	

Статистическая обработка результатов производилась там, где это было возможно, параметрическими (Student's T-Test) и непараметрическими (тест Mann-Whitney) методами.

Результаты и их обсуждение

Полученные в работе данные (представленные в таблицах 3–6 и в обобщающем варианте — в табл. 7) оказалось возможным разделить на два основных раздела.

В первом из этих разделов результаты концентрировались с попыткой установить их зависимость от молекулярно-биологического типа опухоли (определявшегося на основе генетического и иммуногистохимического анализа в соответствии с современной классификацией, предложенной A. Talhouk et al. [1, 7] и использовавшейся нами в предыдущих исследованиях [3, 4]).

По сведениям, полученным при сравнении отдельных типов РЭ, наименьшая величина экспрессии рецепторов эстрогенов (ER) и прогестерона (PR) на основе подсчета индекса Allred (объединяющего в себе долю окрашенных клеток и балл, характеризующий интенсивность окраски в них [23]), выявилась, соответственно, при карциномах эндометрия типов POLE и p53 (табл. 3). «Трижды негативный» вариант опухоли (ER-,PR-, HER2/neu-) — который уже выделялся в общей группе больных РЭ ранее (например, в работе Łapińska-Szumczyk и др. [24]) — был наиболее част при типе POLE (45.5% случаев), оставляя на втором месте тип WCMP (19.3%), и значительно реже обнаруживался при типах MMR-D, а также p53 (в объединенной когорте с позитивной и диффузной экспрессией), причем, в группе, упомянутой последней, этому соответствовала наиболее высокая экспрессия HER2/neu (табл. 3).

Для p53+ типа РЭ была характерна, кроме того, высокая экспрессия макрофагального маркера CD68 (чего не было при типе WCMP) и лимфоцитарного Foxp3, а также мРНК PD-1 и SALL4 (табл. 3,4). Типу WCMP, помимо отмеченного, оказалось, напротив, свойственно снижение экспрессии лимфоцитарных маркеров CD8 (на уровне белка) и PD-L1 (на уровне мРНК) (табл. 4).

При оценке данных, полученных во втором основном разделе работы, где акцент (там, где это было возможно; см. «Материалы и методы») делался на величине индекса массы тела (ИМТ), его значение ≥ 30.0 (характерное для ожирения) сочеталось с повышением экспрессии рецепторов прогестерона в опухолевой ткани и с тенденцией к повышению экспрессии HER-2/neu в случае типа MMR-D. С другой стороны, при типе WCMP для больных с избыточной массой тела (ИМТ ≥ 30.0) были характерны снижение экспрессии лимфоцитарного маркера FOXP3 и рецепторов эстрогенов в опухоли, а также тенденция к снижению в ней экспрессии HER-2/neu (табл. 5 и 6).

Табл. 3. Экспрессия ER и PR по Allred, HER-2/neu и анализ представленности макрофагального маркера CD68 в ткани опухоли при разных типах рака эндометрия (РЭ)

ТИПЫ РЭ	Параметры	ER по Allred	PR по Allred	HER2/neu (баллы)	Доля «трижды-негатив.» случаев (%)	CD68x200
POLE	n	12	12	11		12
	M	3,916667 ^{1,2}	5,250000	0,00	5/11=45.5%	165,6667 ⁵
	m	0,856865	0,993349	0,00		17,00282
	Медиана	5,000	7,000000	0,00		176,000
MMR-D	n	74	74	67		74
	M	5,864865 ¹	5,743243 ³	0,104478 ⁴	1/67=0.015%	123,8378
	m	0,200263	0,283484	0,037651		7,811814
	Медиана	6,000000	6,000000	0,00		118,500
P53 pos	n	11	10			11
	M	5,090909	4,300000 ³			181,0909 ⁶
	m	0,653029	0,955103			29,37731
	Медиана	6,000	4,500000			155,500
P53 pos+mod	n	22	21	17		23
	M	5,045455	5,333333	0,352941 ⁴	1/17=0.59%	119,3913
	m	0,590243	0,618498	0,147059		11,36090
	Медиана	6,000	6,000000	0,00		
WCMP	n	110	108	109	21/109=19.3%	109
	M	5,690909 ²	5,944444	0,128440		115,4587 ^{5,6}
	m	0,182077	0,222417	0,039322		5,856790
	Медиана	6,000	7,000000	0,00		109,500

Примечания: А. Рецепторы эстрогенов (ER) и прогестерона (PR): ¹Стьюдент р<0.05; ²Стьюдент р<0.05; ³Стьюдент р=0.08; Б. Экспрессия HER2/neu: ⁴Стьюдент р=0.09; В. Число CD68+ клеток исследовалось в «горячих точках» с ориентировкой на одно поле микроскопа Leica DM2500 (при увеличении x200 диаметр поля 1,05мм): ⁵Стьюдент р<0.02; ⁶Стьюдент р<0.05; Г. P53 pos — положительная экспрессия p53; P53 pos+mod — положительная и диффузная экспрессия p53 (объединенная группа)

Табл. 4. Иммуногистохимическая оценка лимфоцитарных маркеров FOXP3 и CD8 в «горячих точках» и экспрессия мРНК генов PD-L1, PD-1 и SALL4 в опухолевой ткани при разных типах РЭ

ТИПЫ	параметры	FOXP3	CD8x200	PD-L1 expression (2 ⁻ -delta Ct)	PD-1 expression (2 ⁻ -delta Ct)	SALL4 expression (2 ⁻ -delta Ct)
POLE	n	2	4	10	10	10
	M	8,0000	192,0000	0,158764 ^{3,4,5}	0,008169	0,000009 ⁷
	m	4,00000	60,93029	0,060804	0,005566	0,000005
	Медиана	8,0000	178,5000	0,062124	0,000669	0,000001
MMR-D	n	73	63	61	60	59
	M	15,5753	157,2381 ²	0,043132 ³	0,015832	0,000010
	m	2,82983	17,79387	0,007885	0,011877	0,000004
	Медиана	7,00000	89,00000	0,022406	0,000944	0,000001
P53 pos+mod	n	11	13	19	19	18
	M	33,8182 ¹	165,0000	0,029938 ⁴	0,049262 ⁶	0,000023 ⁷
	m	10,61202	52,28852	0,011921	0,045674	0,000019
	Медиана	25,00000	76,00000	0,000000	0,000561	0,000002
WCMP	n	110	90	90	90	89
	M	10,6545 ¹	101,7222 ²	0,034159 ⁵	0,007602	0,000019
	m	2,97222	12,25771	0,011404	0,004862	0,000006
	Медиана	2,50000	68,00000	0,000000	0,000944	0,000002

Примечания: ¹Стьюдент р<0.05; ²Стьюдент р<0.02; ³Стьюдент р=0.06; ⁴Стьюдент р<0.05; ⁵Стьюдент р<0.05; ⁶Тенденция к наиболее высокому значению экспрессии PD-1 обнаружилась в этой группе, но из-за большого разброса в ней данных статистически значимые различия между большими с другими типами РЭ не найдены. В отношении экспрессии SALL4 наибольшая ее величина выявилась (по средним значениям) при типах WCMP и P53 pos+mod, но из-за уже упоминавшегося разброса индивидуальных результатов отличий от больных с иными типами РЭ найдено не было [⁷ тип P53 pos+mod vs тип POLE: Z adjusted p-level (Mann-Whitney) 1.000]. См. также примечания к табл. 3.

Табл. 5. Иммуногистохимическая оценка лимфоцитарных маркеров FOXP3 и CD8x200 и ряда других изучавшихся факторов при типе рака эндометрия (РЭ) с дефектом mismatch repair (MMR-D); роль индекса массы тела (ИМТ)

ТИП опухоли и величина ИМТ	параметры	FOXP3	CD8x200	CD68x200	ER	PR	HER-2/neu
MMR-D	n	73	63	71	71	71	67
(BCE)	M	15,5753	157,2381	123,8451	5,9437	5,7887	0,0746
ИМТ=32,26±0,81	m	2,82983	17,79387	8,101287	0,190189	0,282213	0,032347
	Медиана	7,00000	89,00000	118,0000	6,0000	6,0000	0,0000
MMR-D	n	21	17	21	21	22	21
(ИМТ <30.0)	M	23,0000 ¹	180,2353 ²	114,0476	5,6667	5,0455 ³	0,0000
ИМТ=25,7±0,51	m	7,79133	31,10165	16,32227	0,41019	0,41019	0,0000
	Медиана	10,0000	187,0000	104,0000	6,0000	6,0000	0,00000
MMR-D	n	750	46	50	50	49	46
(ИМТ ≥30.0)	M	12,5714 ¹	148,7391 ²	127,9600	6,0600	6,1224 ³	0,1087
ИМТ= 38,01±0,90	m	2,45279	21,54988	9,289624	0,208806	0,326849	0,046399
	Медиана	5,00000	82,00000	119,0000	6,0000	7,0000	0,0000

Примечания: FOXP3: ¹Z adjusted p-level (Mann-Whitney)1.000; CD8x200: ²Z adjusted p-level (Mann-Whitney)1.000; PR: ³Стьюдент p<0.05

Табл. 6. Иммуногистохимическая оценка лимфоцитарных маркеров FOXP3 и CD8x200 и ряда других изучавшихся факторов при типе рака эндометрия (РЭ) без характерного молекулярного профиля (WCMP); роль индекса массы тела (ИМТ)

ТИП опухоли и величина ИМТ	параметры	FOXP3	CD8x200	CD68x200	ER	PR	HER-2/neu
WCMP	n	110	90	107	111	110	108
(BCE)	M	10,6545	101,7222	117,2804	5,6847	5,9364	0,120370
ИМТ=34,19±0,91	m	2,97222	12,25771	6,127039	0,180536	0,220802	0,034097
	Медиана	2,50000	68,00000	109,0000	6,0000	7,0000	0,00
WCMP	n	41	39	40	43	42	40
(ИМТ <30.0)	M	21,0976 ¹	104,3333	114,6500	6,3023 ^{2,3}	5,7381	0,1750
ИМТ=25,88±0,50	m	7,54594	21,23703	10,42240	0,21703	0,37806	0,07060
	Медиана	5,00000	67,00000	100,0000	7,0000	6,0000	0,0000
WCMP	n	68	51	69	68	68	68
(ИМТ ≥30.0)	M	3,83824 ¹	99,72549	118,3333	5,2941 ^{2,3}	6,0588	0,0882
ИМТ=39,53±1,02	m	0,89595	14,47982	7,393826	0,25060	0,27147	0,034652
	Медиана	1,00000	69,00000	110,0000	6,0000	7,0000	0,0000

Примечания: FOXP3: ¹Стьюдент p<0.05; ER: ²Стьюдент p<0.02; ER: ³Z adjusted p-level (Mann-Whitney) 0.

При обсуждении представленных результатов, наряду с особенностями, описанными выше и отмеченными в итоговой табл. 7, есть основания отметить, как минимум, три заслуживающих внимания обстоятельства:

а) Накопленная к данному моменту литература неоднозначна в отношении того, при каких типах РЭ в большей степени выражена инфильтрация опухолевой ткани клетками макрофагального и лимфоцитарного ряда и экспрессия маркеров контрольных точек иммунного ответа, в частности PD-1 и PD-L1. Так, по одним наблюдениям, лимфоцитарная инфильтрация (за

счет цитотоксических и регуляторных лимфоцитов) и повышенная экспрессия таких маркеров, как PD-1 и PD-L1, присуща случаям рака эндометрия, принадлежащим к типам с дефектом mismatch-репарации (MMR-D) или с мутацией гена POLE [25, 26, 27], в то время как, по другим публикациям (например, [7]), усиленное лимфоцитарное заселение присуще не только карциномам тела матки типа MMR-D и POLE+, но и тем, в которых выявляется заметная экспрессия онкобелка p53, что ближе (во второй своей части) нашим собственным результатам (табл. 4 и 7).

Табл. 7. Суммария полученных данных при сравнении молекулярно-биологических типов рака эндометрия на основе исследованных показателей

Оценивавшиеся показатели	типы РЭ			
	POLE	MMR-D	p53	WCMP
ER	↑			
PR			↓	
Her2/neu			↑	
EК-,PR-,Her2/neu- (трижды негативные)	↑	↓		↑ *
CD68			↑	
Foxp3			↑	
CD8	↓	↓		↓
mPНК PD-1			↑	
mPНК PD-L1	↑			↓
mPНК SALL4	↓		↑	
ИМТ <30.0				
ИМТ ≥30.0		↑ PR ↑ HER2/neu*		↓ Foxp3,ER ↓ HER2/neu*

Примечания: стрелками показано направление изменения; *характеризует тенденцию

б) Следующий момент, который заслуживает упоминания, состоит в том, что часть расхождений в публикуемых данных может быть обусловлена и особенностями методологии. Так, хотя в ткани немелкоклеточных бронхокарцином экспрессия PD-L1, оценивавшаяся иммуногистохимическим методом или по экспрессии mPНК, продемонстрировала по своей направленности высокую степень соответствия [28], это, не исключено, может наблюдаться не всегда, и в случае РЭ заслуживает отдельного анализа.

в) Наконец, в наших предыдущих исследованиях обращалось внимание на то обстоятельство, что при различных молекулярно-биологических типах РЭ может варьировать не только частота избыточной массы тела, но и выраженность некоторых — казалось бы ассоциированных с величиной ИМТ — гормонально-метаболических стигмат. Так, хотя наибольшее соотношение числа случаев ИМТ≥30.0/ИМТ<30.0 было присуще по средним данным больным с типом MMR-D (т.е. с дефектом репарации ошибочно спаренных нуклеотидов), частота явного сахарного диабета оказалась наиболее высокой при типах без характерного молекулярного профиля (WCMP) и с повышенной экспрессией онкобелка p53, а частота семейного диабета — при типе с мутацией гена POLE: при том, что среднее значение ИМТ в этой группе было ниже, чем при других типах, а соотношение лептин/адипонектин достигало наибольшей величины при типе p53+ [2,4]. Из этих наблюдений, среди прочего, следует, что выявившиеся эндо-

кринные особенности больных РЭ при разных типах опухоли, как видно, заслуживают того, чтобы быть сопоставленными, как с рецепторным фенотипом, так и с иммунноинфильтрацией ткани новообразования.

Заключая, можно резюмировать, что накопленные сведения (характеризующие здесь, преимущественно, гормоночувствительность опухоли и ее лимфоцитарно-макрофагальную инфильтрацию) дополнительно подтверждают делавшийся нами ранее [3,4] вывод о том, что различия между заболевшими раком тела матки женщинами определяются как принадлежностью РЭ к тому или иному молекулярно-биологическому типу (выделяемому по современной классификации [1, 7]), так и особенностями массы тела и, весьма вероятно, выявляемыми при этом гормонально-метаболическими характеристиками, что дает основания использовать информацию такого рода в перспективе в прикладном отношении, имея в виду превентивные и терапевтические мероприятия.

Информация о конфликте интересов

Конфликта интересов ни у кого из авторов статьи не имеется

Информация о спонсорстве и благодарности

Исследование было поддержано грантом РФФИ 18-015-00026

ЛИТЕРАТУРА

1. Talhouk A, McConechy MK, Leung S et al. Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. *Cancer*. 2017, Vol.123(5):P.802-813. doi: 10.1002/cncr.30496.
2. Берштейн Л.М., Порошина Т.Е., Васильев Д.А., Коваленко И.М., Иванцов А.О., Иевлева А.Г., Берлев И.В. Сравнительные особенности состояния углеводного обмена и массы тела при различных молекулярно-биологических типах рака эндометрия. *Вопр. онкол*, 2018, т. 64 (3): С.394-398.
3. Берштейн Л.М., Иевлева А.Г., Иванцов А.О., Васильев Д.А., Клещев М.А., Порошина Т.Е., Коваленко И.М., Венина А.Р., Берлев И.В. Современные молекулярно-биологические типы рака эндометрия: сравнительная эндокринная и провоспалительно-прогенотоксическая характеристика. *Вопр.онкол*. 2019, т.65 (2): С.272-278.
4. Berstein LM, Iyevleva AG, Ivantsov AO, Vasilyev DA, Poroshina TE, Berlev IV. Endocrinology of obese and nonobese endometrial cancer patients: is there role of tumor molecular-biological type? *Future Oncol*. 2019, Vol. 15(12): P.1335-1346. doi: 10.2217/fo-2018-0687.
5. Dun EC, Hanley K, Wieser F, Bohman S, Yu J, Taylor RN. Infiltration of tumor-associated macrophages is increased in the epithelial and stromal compartments of endometrial carcinomas. *Int J Gynecol Pathol*. 2013; Vol.32(6): P.576-584. doi: 10.1097/PGP.0b013e318284e198.

6. Machida H, De Zoysa MY, Takiuchi T, Hom MS, Tierney KE, Matsuo K. Significance of Monocyte Counts at Recurrence on Survival Outcome of Women with Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2017; Vol. 27(2): P.302-310. doi: 10.1097/IGC. 0000000000000865.
7. Talhouk A, Derocher H, Schmidt P, Leung S, Milne K, Gilks CB et al. Molecular Subtype Not Immune Response Drives Outcomes in Endometrial Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2019 ; Vol.25(8):P.2537-2548. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3241.
8. de Jong RA, Leffers N, Boezen HM, ten Hoor KA, van der Zee AG, Hollema H, Nijman HW. Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2009; Vol.114(1):P.105-110. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.03.022.
9. Леенман Е.Е., Мухина М.С. Клеточное микроокружение злокачественных опухолей и его значение в прогнозе // *Вопр.онкол.* 2013. Т.59(4). С.444-452.
10. Перельмутер В.М., Таширева Л.А., Манских В.Н., Денисов Е.В., Савельева О.Е., Кайгородова Е.В., Завьялова М.В. Иммуновоспалительные реакции в микроокружении гетерогенны, пластичны, определяют противоопухолевый эффект или агрессивное поведение опухоли. *Журнал общей биологии* 2017, Т.78(5), С.15-36.
11. Иммунная система и эффективность противоопухолевого лечения /Ю. Г. Кжышковска, М. Н. Стахеева, Н. В. Литвяков, О. Е. Савельева, И. В. Митрофанова, И. В. Степанов, А. Н. Грачев, Т. С. Геращенко, М. В. Завьялова, Н. В. Чердынцева.; под ред. Ю. Г. Кжышковской, Н. В. Чердынцевой; Томский гос. ун-т, Томский НИИ онкологии. — Томск: Изд-во ТГУ, 2015. — 164 с. — ISBN — 978-5-7511-2391-8. DOI: 10.17223978-5-7511-2391-8
12. Eggink FA, Van Gool IC, Leary A, Pollock PM, Crosbie EJ, Mileskin L, Bosse T. et al. Immunological profiling of molecularly classified high-risk endometrial cancers identifies POLE-mutant and microsatellite unstable carcinomas as candidates for checkpoint inhibition. *Oncoimmunology*. 2016; Vol.6(2):e1264565. doi: 10.1080/2162402X.2016.1264565.
13. Gadducci A, Guerrieri ME. Immune Checkpoint Inhibitors in Gynecological Cancers: Update of Literature and Perspectives of Clinical Research. *Anticancer Res*. 2017; Vol. 37(11): P.5955-5965.
14. De Felice F, Marchetti C, Tombolini V, Panici PB. Immune check-point in endometrial cancer. *Int J Clin Oncol*. 2019; Vol. 24(8): P.910-916. doi: 10.1007/s10147-019-01437-7.
15. Szyllberg Ł, Karbownik D, Marszałek A. The Role of FOXP3 in Human Cancers. *Anticancer Res*. 2016; Vol. 36(8): P.3789-3794.
16. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; Vol.26: P.677-704
17. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;Vol. 12: P.252-264
18. Gao C, Kong NR, Li A, Tatetu H, Ueno S, Yang Y et al. SALL4 is a key transcription regulator in normal human hematopoiesis. *Transfusion*. 2013; Vol.53(5):P. 1037-1049. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03888.x.
19. Li A, Jiao Y, Yong KJ, Wang F, Gao C, Yan B et al. SALL4 is a new target in endometrial cancer. *Oncogene*. 2015; Vol.34(1):P.63-72. doi: 10.1038/onc.2013.529.
20. Onstad MA, Schmandt RE, Lu KH. Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment. *J Clin Oncol*. 2016;Vol.34(35):P.4225-4230.
21. Stelloo E, Jansen AML, Osse EM et al. Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer. *Ann Oncol*. 2017, Vol.28(1): P. 96-102.
22. Mitiushkina NV, Iyevleva AG, Poltoratskiy AN, Ivantsov AO, Togo AV, Polyakov IS et al. Detection of EGFR mutations and EML4-ALK rearrangements in lung adenocarcinomas using archived cytological slides. *Cancer Cytopathol* Vol.2013; P.121:370-376.
23. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999; Vol.17(5): P.1474-1481.
24. Łapińska-Szumczyk SM, Supernat AM, Majewska HI, Gulczyński J, Biernat W, Wydra D, Żaczek AJ. Immunohistochemical characterisation of molecular subtypes in endometrial cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2015; Vol. 8(11):21981-21990.
25. Howitt BE, Shukla SA, Sholl LM, Ritterhouse LL, Watkins JC, Rodig S et al. Association of Polymerase e-Mutated and Microsatellite-Unstable Endometrial Cancers With Neoantigen Load, Number of Tumor-Infiltrating Lymphocytes, and Expression of PD-1 and PD-L1. *JAMA Oncol*. 2015; 1(9):1319-1323.
26. Gargiulo P, Della Pepa C, Berardi S, Califano D, Scala S, Buonaguro L et al. Tumor genotype and immune microenvironment in POLE-ultramutated and MSI-hypermutated Endometrial Cancers: New candidates for checkpoint blockade immunotherapy? *Cancer Treat Rev*. 2016;48:61-68.
27. Asaka S, Yen TT, Wang TL, Shih IM, Gaillard S. T cell-inflamed phenotype and increased Foxp3 expression in infiltrating T-cells of mismatch-repair deficient endometrial cancers. *Mod Pathol*. 2019; 32(4): 576-584.
28. Erber R, Stöhr R, Herlein S, Giedl C, Rieker RJ, Fuchs F et al. Comparison of PD-L1 mRNA Expression Measured with the CheckPoint Typer® Assay with PD-L1 Protein Expression Assessed with Immunohistochemistry in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 2017; 37(12):6771-6778.

Поступила в редакцию 29.10.2019 г.

*L.M. Berstein¹, A.O. Ivantsov¹, A.G. Iyevleva¹,
A.R. Venina¹, I.V. Berlev^{1,2}*

**Steroid receptor phenotype, expression
of HER-2/neu, PD-1, PD-L1 and lymphocytic-
macrophagal infiltration of endometrial
carcinomas: comparison of modern molecular
biological types of the disease
(the role of body mass index)**

¹N. N. Petrov National Medical Research Center
of Oncology, St. Petersburg,

²I. I. Mechnikov North-Western State Medical University,
St. Petersburg

The aim of this study was to evaluate steroid receptors' status of tumor tissue in different molecular biological types of endometrial cancer (EC), subdivided according to the current classification, and their colonization by lymphocytic and macrophage cells, taking into account body mass index of the patients. Materials and methods: Material from treatment-naive patients with EC (total n = 229) was included; the number of sick persons varied depending on the method used. The average age of patients was close to 60 years, and about 90% of them were postmenopausal. It was possible to divide the results of the work into two main subgroups: a) depending on the molecular biological type of the tumor (determined on the basis of genetic and immunohistochemical analysis), and b) depending on the value of the body mass index (BMI). The latter approach was used in patients with EC type demonstrating a defective mismatch repair of the incorrectly paired nucleotides (MMR-D) and with a type without characteristic molecular profile signs (WCMP), but was not applied (due to the smaller number of patients) in EC types with a POLE gene mutation or with expression of the oncoprotein p53.

According to the data obtained, when comparing various types of EC, the lowest values of Allred ER and PR scores were revealed for POLE-mutant and p53 types, while the "triple-negative" variant of the tumor (ER-, PR-, HER2/neu-) was most common in POLE-mutant (45.5% of cases) and WCMP (19.4%) types of EC. The p53+ type of EC is characterized by inclination to the higher expression of the macrophage marker CD68 and lymphocytic Foxp3, as well as mRNA of PD-1 and SALL4. In addition to the said above, for WCMP type of EC is peculiar, on the contrary, a decrease in the expression of lymphocytic markers CD8 (protein) and PD-L1 (mRNA).

When assessing the role of BMI, its value of >30.0 (characteristic for obesity) was combined with an inclination to the increase of HER-2/neu expression in the case of MMR-D EC type and to the decrease of HER-2 /neu, FOXp3 and ER expression in WCMP type.

Conclusions: The accumulated information (mainly describing here hormonal sensitivity of the tumor tissue and its lymphocytic-macrophage infiltration) additionally confirms our earlier expressed opinion that the differences between women with EC are determined by both the affiliation of the neoplasm to one or another molecular biological type (subdivided according to the contemporary classification), as well as by body mass value and (very likely) the associated hormonal and metabolic attributes.

Key words: endometrial cancer, molecular-biological types, tumor tissue receptor phenotype, macrophagal-lymphocytic infiltration, immunogenicity, mutational load