

КОМПЛЕКС ИНФОРМАТИВНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ПРОГНОЗА ПРОГРЕССИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Стахеева М.Н.¹, Серых А.П.², Карась С.И.³, Перина Е.А.³

¹ Томский НИИ онкологии, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

³ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

РЕЗЮМЕ

Прогнозирование исхода злокачественных новообразований является важным этапом медицинского сопровождения онкологических больных. Данная статья направлена на выявление комплекса иммунологических показателей как критерия прогноза рака молочной железы (РМЖ).

Цель исследования – выявить необходимое и достаточное количество параметров иммунной системы для надежной классификации случаев РМЖ с различным исходом – наличием или отсутствием развившихся гематогенных метастазов.

Материал и методы. У 197 больных РМЖ стадии T₁₋₄N₀₋₃M₀ исследованы 36 показателей состояния иммунной системы. Для решения задачи выявления информативных признаков был использован алгоритм ближайшего соседа. Обнаружение совокупности информативных признаков проводилось способами добавления (ADD) и удаления (DEL) переменных.

Результаты. Выявлены два комплекса информативных иммунологических показателей, отражающих преимущественно состояние Т-клеточного (ADD) и гуморального (DEL) звеньев иммунной системы.

Вывод. Для классификации случаев РМЖ по категории наличие/отсутствие гематогенного метастазирования у больных РМЖ необходимым является комплекс, в который входит от 17 до 19 показателей, отражающий морфофункциональное состояние различных звеньев иммунной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: критерии прогноза, рак молочной железы, иммунная система, информативность.

Введение

Прогнозирование исхода злокачественных новообразований является важным этапом медицинского сопровождения онкологических больных. Это определяет выбор объема противоопухолевой терапии и наиболее эффективной схемы цитостатического или таргетного лечения [1–3]. Для решения прогностических задач в медицине, как правило, применяются методы распознавания образов или классификации по значениям измеряемых признаков [4, 5].

В настоящее время возможность использования иммунологических показателей в качестве критериев прогноза показана для довольно широкого ряда локализаций [6–10]. Однако существует проблема практи-

ческого применения показателей иммунной системы, обусловленная разнородностью выявляемых потенциальных прогностических маркеров для различных локализаций и отсутствием их валидации [11, 12]. При этом в качестве критерия прогноза часто предлагают какой-либо один из параметров, характеризующих отдельный иммунологический механизм [9, 10, 13].

Хорошо известно, что участие иммунной системы в патогенезе злокачественного роста и, в частности, рака молочной железы (РМЖ) многообразно и амбивалентно [14]. Это обусловлено сложностью опухолевого процесса как биологического феномена, многочисленностью взаимосвязей «опухоль – организм», реализуемых, в том числе, и посредством иммунной системы. На наш взгляд, единичный параметр, отражающий отдельный, пусть и значимый механизм, не может служить эффективным критерием прогноза

✉ Стахеева Марина Николаевна, тел. 8-903-915-8528;
e-mail: StakheyevaM@oncology.tomsk.ru

исхода заболевания. Подтверждением этому служит ряд статей, показавших прогностическую ценность комплекса показателей, отражающего паттерн иммунологического ответа [7, 8, 15].

Цель исследования – определение количества параметров иммунной системы, необходимых и достаточных для надежной классификации случаев РМЖ с различным исходом – наличием или отсутствием развившихся гематогенных метастазов.

Материал и методы

В исследование были включены 197 больных с верифицированным диагнозом РМЖ стадии T₁₋₄N₀₋₃M₀, находившихся на лечении в Томском НИИ онкологии (г. Томск). До начала противоопухолевого лечения у пациенток оценивали 36 показателей, характеризующих различные звенья иммунной системы. Показатели и методы их оценки представлены в таблице.

Иммунологические показатели, использованные в исследовании, и методы их оценки	
Показатель	Метод оценки
Количество CD3 ⁺ -клеток, %	Иммуноцитохимический
Количество CD3 ⁺ -клеток, 10 ⁹ /л	Гематологический
Количество CD4 ⁺ -клеток, %	Иммуноцитохимический
Количество CD4 ⁺ -клеток, 10 ⁹ /л	Гематологический
Количество CD8 ⁺ -клеток, %	Иммуноцитохимический
Количество CD8 ⁺ -клеток, 10 ⁹ /л	Гематологический
Количество CD22 ⁺ -клеток, %	Иммуноцитохимический
Количество CD22 ⁺ -клеток, 10 ⁹ /л	Гематологический
Количество CD56 ⁺ -клеток, %	Иммуноцитохимический
Количество CD56 ⁺ -клеток, 10 ⁹ /л	Гематологический
Количество CD25 ⁺ -клеток, %	Иммуноцитохимический
Количество CD25 ⁺ -клеток, 10 ⁹ /л	Гематологический
Количество CD95 ⁺ -клеток, %	Иммуноцитохимический
Количество CD95 ⁺ -клеток, 10 ⁹ /л	Гематологический
Количество HLA-DR ⁺ -клеток, %	Иммуноцитохимический
Количество Fas-L ⁺ -клеток, %	Иммуноцитохимический
Количество CCR5 ⁺ -клеток, %	Иммуноцитохимический
Общее количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л	Гематологический
Количество лимфоцитов, 10 ⁹ /л	Гематологический
Количество лимфоцитов, %	Гематологический
Уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови	Нефелометрический
Активность системы комплемента	Серологический
Спонтанная активность нейтрофилов, %	НСТ-тест
Спонтанная активность нейтрофилов, усл. ед.	НСТ-тест
Функциональный резерв нейтрофилов, %	НСТ-тест
Функциональный резерв нейтрофилов, усл. ед.	НСТ-тест
Продукция ИЛ-10 мононуклеарными клетками периферической крови, пг/мл, спонтанный вариант	Иммуноферментный анализ
Продукция ИЛ-10 мононуклеарными клетками периферической крови, пг/мл, стимулированный вариант	Иммуноферментный анализ
Продукция ИНФ-γ мононуклеарными клетками периферической крови, пг/мл, спонтанный вариант	Иммуноферментный анализ
Продукция ИНФ-γ мононуклеарными клетками периферической крови, пг/мл, стимулированный вариант	Иммуноферментный анализ
Уровень иммуноглобулина G, г/л	Иммуноферментный анализ
Уровень иммуноглобулина A, г/л	Иммуноферментный анализ
Уровень иммуноглобулина M, г/л	Иммуноферментный анализ
Уровень sFas белка в сыворотке крови, пг/мл	Иммуноферментный анализ
Уровень клеток периферической крови с морфологическими признаками апоптоза	Флюоресцентная микроскопия с красителем Hoechst 33342
Иммунорегуляторный индекс	CD4/CD8

Всем пациенткам было проведено противоопухолевое лечение, включавшее 2–4 курса неoadъювантной химиотерапии, хирургическое удаление первичного опухолевого узла, адъювантную химио-, радио- и гормонотерапию по показаниям. Затем в течение трех лет отмечали факт развития гематогенного метастазирования, после чего пациентки были объединены в две группы в зависимости от исхода – наличия или отсутствия метастазов. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании, имеется разрешение локального комитета по биомедицинской этике Томского НИИ онкологии.

Для решения задачи выявления информативных признаков был применен алгоритм ближайшего соседа [5], реализованный в программе MathCad. Обнаружение совокупности информативных признаков проводилось двумя способами. Алгоритм ADD заключается в последовательном добавлении признаков к набору, используемому для классификации. Алгоритм DEL, напротив, реализует пошаговое удаление признаков из классификационного набора. Критерием качества распознавания является вероятность ошибки классификации [4]. Все вычислительные эксперименты осуществлялись с использованием скользящего контроля.

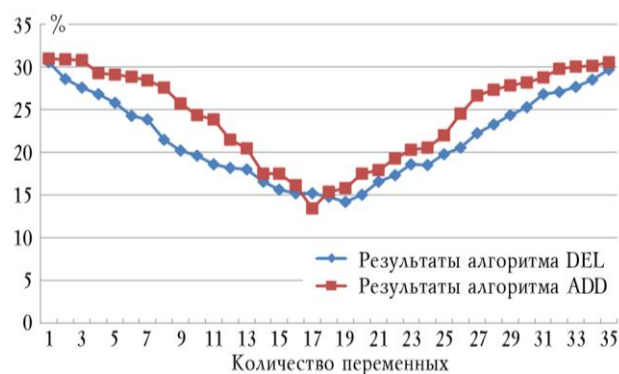
Результаты и обсуждение

Полный перебор вариантов – тривиальный и результативный способ отбора информативных признаков, пригодный для их малого числа [5]. Вместо полного перебора можно начать с фиксированного набора признаков и последовательными операциями дополнения и (или) исключения признаков добиться улучшения качества классификации.

Вначале для выявления совокупности информативных признаков был использован алгоритм ADD. Алгоритм включает первичную проверку всего множества рассматриваемых признаков и выбор такого элемента, который приводит к наименьшей ошибке классификации. Затем последовательно рассматриваются двухэлементные наборы, содержащие полученный на предыдущем шаге самый информативный элемент, в итоге чего выбирается оптимальный двухэлементный набор. Далее процедура повторяется с пошаговым увеличением количества используемых для классификации элементов. Алгоритм прекращает свою работу, когда улучшить качество классификации больше не удастся.

Результаты пошагового выполнения алгоритма ADD представлены на рисунке. Минимальная вероятность ошибки ($p = 13,41\%$) достигается при наборе,

включающем 17 признаков, в который входят общее количество лейкоцитов, относительное содержание лимфоцитов, относительное и абсолютное содержание $CD3^+$ зрелых Т-лимфоцитов, $CD4^+$ Т-хелперов, $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов, $CD16^+$ NK-клеток, иммунорегуляторный индекс $CD4/CD8$, абсолютное количество $CD95^+$ -лимфоцитов (маркер поздней активации), уровни иммуноглобулинов G и A, показатели спонтанной и стимулированной активности нейтрофилов. При дальнейшей работе алгоритма увеличение набора признаков приводит к увеличению вероятности ошибки.



Вероятность ошибки классификации случаев «метастазирование/отсутствие метастазирования» в зависимости от количества информативных иммунологических признаков

Отбор информативных признаков алгоритмом DEL аналогичен алгоритму ADD с той разницей, что признаки исключаются, а не добавляются. Результаты использования алгоритма DEL приведены на рисунке, при наборе 19 признаков получена минимальная вероятность ошибки (14,25%). В это множество признаков входят общее количество лейкоцитов, относительное содержание лимфоцитов, относительное и абсолютное содержание $CD4^+$ Т-хелперов, $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов, $CD16^+$ NK-клеток, $CD20^+$ В-лимфоцитов, иммунорегуляторный индекс $CD4/CD8$, абсолютное количество $CD95^+$ -лимфоцитов (маркер поздней активации), относительное количество $CD95-L^+$ цитотоксических лимфоцитов, уровни иммуноглобулинов G и M, показатели спонтанной и стимулированной активности нейтрофилов.

Оба выявленных набора информативных показателей близки по своему составу и включают параметры, характеризующие морфофункциональное состояние основных звеньев иммунной системы. Главной особенностью набора переменных, полученного при использовании алгоритма ADD, являлось включение такого показателя Т-клеточного звена (главного эффекторного механизма противоопухолевой защиты организма), как $CD3^+$ Т-лимфоциты. Алгоритм DEL включал параметры гуморального ответа – количество

В-лимфоцитов (CD22⁺-клетки) в периферической крови, уровень иммуноглобулина М, количество лимфоцитов, экспрессирующих Fas-L, – как значимые для классификации исходов РМЖ.

Заключение

Для классификации случаев РМЖ по категории наличие/отсутствие гематогенного метастазирования у больных РМЖ необходимым является комплекс, включающий от 17 до 19 показателей, отражающий морфофункциональное состояние различных звеньев иммунной системы. Полученные результаты позволяют заключить, что выявленные наборы информативных показателей связаны с определенным паттерном реагирования иммунной системы [15]. Соответственно, в качестве критерия прогноза гематогенного метастазирования может быть использован комплекс показателей, связанный с определенным паттерном реагирования.

Литература

1. Божок А.А., Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. и др. Прогностические и предсказательные факторы при раке молочной железы // Вопросы онкологии. 2005. № 51 (4). С. 434–443.
2. Боженко В.К., Рожкова Н.И., Кудинова Е.А., Троценко И.Д. Профиль экспрессии генов как фактор прогноза при раке молочной железы // Вестник РНЦПР МЗ РФ. 2011. № 4 (11). URL: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/bozh2_v11.htm (in Russian).
3. Heuvers M.E., Aerts J.G., Cornelissen R. et al. Patient-tailored modulation of the immune system may revolutionize future lung cancer treatment // BMC Cancer. 2012. vol. 12. P. 580. doi: 10.1186/1471-2407-12-580.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
5. Фукунага К. Введение в статистическую теорию распознавания образов. М.: Наука, 1979. 386 с.
6. Стахеева М.Н., Эйдензон Д.В., Слонимская Е.М. и др. Взаимосвязь состояния иммунной системы как интегрированного целого с клиническим течением рака молочной железы // Сиб. онкол. журн. 2011. (2). С. 11–19.
7. Galon J., Pages F., Marincola F.M. et al. The Immune Score as a New Possible Approach for the Classification of Cancer // Journal of Translational Medicine. 2012. 10:1. doi: 10.1186/1479-5876-10-1.
8. Matsueda S. Humoral immune responses to CTL epitope peptides from tumor-associated antigens are widely detectable in humans: A new biomarker for overall survival of patients with malignant diseases // Developmental and Comparative Immunology. 2013. 41 (1). P. 68–76.
9. Muenst S., Soysal S.D., Gao F. et al. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer // Breast Cancer Res Treat. 2013. 139 (3). P. 667–676. doi: 10.1007/s10549-013-2581-3.
10. Pichler M., Hutterer G.C., Stoekigt C. et al. Validation of the pre-treatment neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in a large European cohort of renal cell carcinoma patients // Br. J. Cancer. 2013. 108(4). P. 901–907. doi: 10.1038/bjc.
11. Fox B.A., Schendel D.J., Butterfield L.H. et al. Defining the Critical Hurdles in Cancer Immunotherapy // Journal of Translational Medicine. 2011. 9. P. 214. doi: 10.1186/1479-5876-9-214.
12. Whiteside T.L. Immune Responses to Cancer: Are They Potential Biomarkers of Prognosis? // Front Oncol. 2013. 3. P. 107. doi: 10.3389/fonc.2013.00107.
13. McCoy M.J., Nowak A.K., van der Most R.G. Peripheral CD8⁺ T cell proliferation is prognostic for patients with advanced thoracic malignancies // Cancer Immunology, Immunotherapy. 2013. 62 (3). P. 29–39. doi: 10.1007/s00262-012-1360-z.
14. Swann J.B., Smyth M.J. Immune surveillance of tumors // The Journal of Clinical Investigation. 2007. 117 (5). P. 1137–1146.
15. Lippitz B.E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review // Lancet Oncol. 2013. 14 (6). P. 218–228. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70582-X.

Поступила в редакцию 13.04.2015 г.

Утверждена к печати 27.05.2015 г.

Стахеева Марина Николаевна (✉) – д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии Томского НИИ онкологии (г. Томск).

Серых Александр Петрович – канд. техн. наук, доцент кафедры высшей математики и математического моделирования НИ ТГУ (г. Томск).

Карась Сергей Иосифович – д-р мед. наук, профессор кафедры кибернетики СибГМУ (г. Томск).

Перина Екатерина Александровна – студентка медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

✉ Стахеева Марина Николаевна, тел. 8-903-915-8528; e-mail: StakheyevaM@oncology.tomsk.ru

THE COMPLEX OF INFORMATIVE IMMUNOLOGICAL PARAMETERS FOR BREAST CANCER OUTCOME PROGNOSIS

Stakheyeva M.N.¹, Serykh A.P.², Karas S.I.³, Perina E.A.³

¹ Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russian Federation

² National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

Prognosis of disease outcome is important procedure for cancer patients treatment. The article presents the problem of elicitation of breast cancer prognosis criteria from immunological data as parameters complex.

The aim is to identify necessary and sufficient amount of immunological parameters for accurate classification of breast cancer patients with various outcomes – clinical remission and hematogenous metastases.

Material and methods. 36 immunological parameters were studied in 197 breast cancer patients T₁₋₄N₀₋₃M₀. The “next neighbor” algorithm was used for identification of informative parameters. Detection of informative parameters complex was carried out by using ADD and DEL methods.

Results. Two sets of informative immunological parameters were detected. The ADD method elicited parameters related to T-cell immunity, DEL – to humoral response.

Conclusions. The complex of 17–19 immunological parameters characterizing different elements of immune system is necessary for accurate classification of breast cancer patients with different outcomes (presence/absence of hematogenous metastases).

KEY WORDS: prognosis criteria, breast cancer, immune system, information value.

Bulletin of Siberian Medicine, 2015, vol. 14, no. 3, pp. 30–34

References

- Bozhok A.A., Semiglazov V.F., Semiglazov V.V. et al. Prognosis and predictive factors in breast cancer. *Voprosy onkologii – Problems in Oncology*, 2005, no. 51 (4), pp. 434–443 (in Russian).
- Bozhenko V.K., Rozhkova N.I., Kudina Ye.A., Trotsenko I.D. Gene expression profile as prognosis factor in breast cancer. *Vestnik of RNCPP MH RF*, 2011, no. 4 (11). URL: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/~v11/papers/bozh2_v11.htm (in Russian).
- Heuvers M.E., Aerts J.G., Cornelissen R. et al. Patient-tailored modulation of the immune system may revolutionize future lung cancer treatment. *BMC Cancer*, 2012, vol. 12, p. 580. doi: 10.1186/1471-2407-12-580.
- Glants S. *Medico-biological statistics*. Moscow, Practics Publ., 1998. 459 p. (in Russian).
- Fukunaga K. *Introduction in statistical theory of images recognition*. Moscow, Science Publ., 1979. 386 p. (in Russian).
- Stakheyeva M.N., Eidenzon D.V., Slonimskaya E.M. et al. The interrelationship between the immune system state as integrated unity and breast cancer clinical course. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal – Siberian Journal of Oncology*, 2011, (2), pp. 11–19 (in Russian).
- Galon J., Pages F., Marincola F.M. et al. The Immune Score as a New Possible Approach for the Classification of Cancer. *Journal of Translational Medicine*, 2012, 10, 1. doi: 10.1186/1479-5876-10-1.
- Matsueda S. Humoral immune responses to CTL epitope peptides from tumor-associated antigens are widely detectable in humans: A new biomarker for overall survival of patients with malignant diseases. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 41 (1), pp. 68–76.
- Muenst S., Soysal S.D., Gao F. et al. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, 2013, 139 (3), pp. 667–676. doi: 10.1007/s10549-013-2581-3.
- Pichler M., Hutterer G.C., Stoeckigt C. et al. Validation of the pre-treatment neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in a large European cohort of renal cell carcinoma patients. *Br. J. Cancer*, 2013, 108 (4), pp. 901–907. doi: 10.1038/bjc.
- Fox B.A., Schendel D.J., Butterfield L.H. et al. Defining the Critical Hurdles in Cancer Immunotherapy. *Journal of Translational Medicine*, 2011, 9, p. 214. doi: 10.1186/1479-5876-9-214.
- Whiteside T.L. Immune Responses to Cancer: Are They Potential Biomarkers of Prognosis? *Front Oncol.*, 2013, vol. 3, p. 107. doi: 10.3389/fonc.2013.00107.
- McCoy M.J., Nowak A.K., van der Most R.G. Peripheral CD8⁺ T cell proliferation is prognostic for patients with advanced thoracic malignancies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2013, 62 (3), pp. 29–39. doi: 10.1007/s00262-012-1360-z.
- Swann J.B., Smyth M.J. Immune surveillance of tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117 (5), pp. 1137–1146.
- Lippitz B.E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol*, 2013, 14 (6), pp. 218–228. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70582-X.

Stakheyeva Marina N. (✉), Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russian Federation.

Serykh A.P., National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation.

Karas Sergey I., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Perina E.A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Stakheyeva Marina N.**, Ph. +7-903-915-8528; e-mail: StakheyevaM@oncology.tomsk.ru