

Ю.Д. Винничук  
О.Б. Белова  
Е.А. Кирнасовская  
В.И. Тарутинов  
Л.Ю. Ковалева  
Н.М. Бережная

Институт экспериментальной  
патологии, онкологии  
и радиобиологии  
им. Р.Е. Кавецкого  
НАН Украины, Киев, Украина

**Ключевые слова:** молочная железа, доброкачественные опухоли, злокачественные опухоли, лимфоциты, лимфокинактивированные клетки.

## ОСОБЕННОСТИ РОСТА ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ДИФфуЗИОННЫХ КАМЕРАХ

**Резюме.** Изучен характер роста эксплантатов доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы человека параллельно с определением противоопухолевой активности аутологичных лимфоцитов периферической крови. При сравнительном изучении были показаны различия роста эксплантатов указанных опухолей в диффузионных камерах. Указанные отличия проявлялись интенсивностью миграции клеток из эксплантатов, образованием разных по площади участков монослоя низкой и средней плотности. Показано также преобладание противоопухолевой активности неактивированных и активированных интерлейкинов-2 лимфоцитов периферической крови больных со злокачественными опухолями по сравнению с лимфоцитами больных с доброкачественными опухолями. Полученные результаты могут быть использованы как еще один важный критерий малигнизации опухолей молочной железы.

### ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) занимает ведущее место в структуре онкологических заболеваний женского населения, что обуславливает постоянный поиск новых, более эффективных методов диагностики и лечения этой патологии [1]. К известным факторам риска возникновения РМЖ относятся наследственная предрасположенность, отсутствие детей или рождение ребенка в зрелом возрасте, применение гормонов в постменопаузальный период, индекс массы тела [2]. С достаточно большой частотой имеет место развитие и доброкачественных опухолей, риск малигнизации которых достаточно значителен. С целью профилактики развития и ранней диагностики РМЖ проводят маммографические и ультразвуковые исследования, клиническое наблюдение за больными, гистологическое исследование операционного и биопсийного материала [3, 4].

Нередко при благополучном гистологическом диагнозе после удаления доброкачественной опухоли, больные вновь обращаются по поводу новообразования, которое, в значительном количестве случаев, имеет все признаки малигнизации [5]. В связи с этим приобретает несомненное значение поиск признаков, которые могут быть использованы в качестве прогнозирования малигнизации доброкачественных опухолей. Эти признаки, как правило, основаны на сравнительном изучении свойств клеток доброкачественных и злокачественных опухолей. В качестве примера можно привести определение онкогенов и их продуктов, маркеров апоптоза, рецепторов гормонов и факторов роста. Показано, что высокая экспрессия p53, онкопро-

теина c-erbB-2, TGFβ играет важную роль в развитии аденокарциномы *in situ* [6]. Оценить биологическую агрессивность и метастатический потенциал опухолей молочной железы (МЖ) можно и при изучении клеточной пролиферации (экспрессия Ki-67, PCNA) [7–9].

Ранее нами для изучения особенностей роста доброкачественных опухолей МЖ (фиброаденоматоз) и формирования групп риска был разработан метод культивирования эксплантатов опухолей в диффузионных камерах. Результаты исследований показали, что у всех больных, в культуре эксплантатов которых были выявлены множественные конгломераты (плотно прилегающие друг к другу клетки) и сфероиды (упорядоченные колониеподобные структуры с признаками спиральной ориентации, которые на фильтрах диффузионных камер имеют вид полусфер) [10], по истечении года был установлен диагноз: РМЖ с метастазами в подмышечных лимфатических узлах [11].

Продолжая это направление исследований, для получения новых дополнительных критериев характеристики опухолей МЖ нами было проведено сравнительное изучение особенностей роста как доброкачественных, так и злокачественных опухолей МЖ параллельно с изучением противоопухолевого действия неактивированных и активированных лимфоцитов периферической крови больных по отношению к аутологичным опухолевым клеткам.

### ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опухолевая ткань и лимфоциты периферической крови (ЛПК) были получены от пациентов с доброкачественными и злокачественными

опухольями МЖ, на что пациентки дали информированное согласие. Всего изучены материалы от 20 больных (8 — с диагнозом карцинома МЖ и 12 — с фиброаденомами (7), фиброзно-кистозными мастопатиями (2), фиброаденоматозам (1), папилломой с изъязвлениями (1), макромастией (1)), находящихся на стационарном лечении в отделении хирургии Киевской больницы № 1. У 3 был диагностирован РМЖ II, у 4 — III стадии заболевания.

При исследовании опухолевой ткани использовали эксплантаты опухоли (кусочки опухолевой ткани размером до 0,2 мм<sup>3</sup>). ЛПК выделяли из цельной гепаринизированной крови (из локтевой вены больных, натощак) путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина.

Для получения ЛАК клетки инкубировали с ронколейкином-2 (1000 МЕ/мл; БИОТЕХ, Россия) на протяжении 2 ч при 37 °С, затем 2 раза отмывали.

Рост опухолевых клеток (ОК) и их взаимодействие с лимфоцитами изучали при их совместном культивировании в диффузионных камерах. Клетки культивировали на протяжении 5 сут в полной среде RPMI-1640 (Sigma, США) при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. После окончания срока культивирования фильтры диффузионных камер фиксировали, окрашивали гематоксилином Караччи, проводили через спирты возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле, готовили препараты с использованием канадского бальзама и микроскопировали.

Для характеристики опухолевого роста использовали следующие морфологические критерии: деградация опухолевых клеток, отсутствие миграции клеток из эксплантата; миграция единичных опухолевых клеток, расселение опухолевых клеток по фильтру и образование монослоя различной плотности; наличие конгломератов клеток; образование сфероидов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование особенностей роста эксплантатов злокачественных и доброкачественных опухолей МЖ при их культивировании в диффузионных камерах выявило определенные отличия. Рост эксплантатов злокачественных опухолей характеризовался выраженной интенсивностью: активная миграция клеток из эксплантатов, расселение по всему фильтру диффузионной камеры, образование разных по размеру участков монослоя низкой и средней плотности; в одном случае наблюдались начальные этапы образования конгломератов клеток. В отличие от этого рост эксплантатов доброкачественных опухолей был незначительным, наблюдали только миграцию единичных клеток вокруг эксплантата и лишь в одном случае начальные этапы образования монослоя (рис. 1, 2).

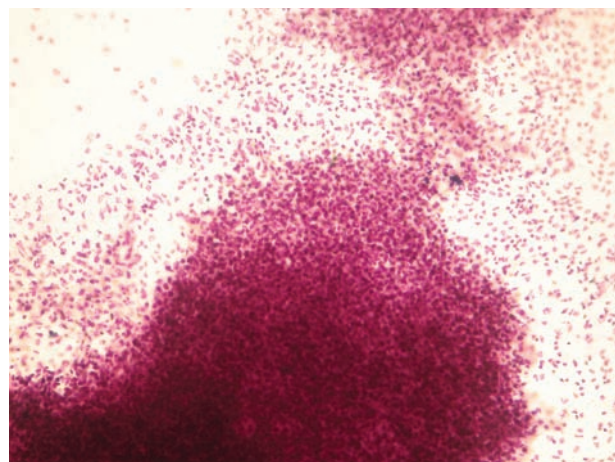


Рис. 1. Рост ОК больной с диагнозом карцинома МЖ (культивирование в диффузионной камере), х 400



Рис. 2. Отсутствие миграции клеток из эксплантата опухоли больной с диагнозом фиброаденома (культивирование в диффузионной камере), х 400

Изучение противоопухолевого действия неактивированных ЛПК и лимфокинаktivированных клеток (ЛАК) показало, что оно проявляется по-разному в отношении клеток доброкачественных и злокачественных опухолей. Так, если у всех больных с карциномами действие ЛПК характеризовалось миграцией из эксплантатов единичных клеток и отсутствием монослоя, в сравнении с выраженным монослоем различной плотности и начальными этапами образования конгломератов ОК в контроле, то противоопухолевое действие ЛПК пациентов с доброкачественными опухолями было выражено незначительно и наблюдалось только в 4 случаях из 12. При сочетанном культивировании неактивированных ЛПК и эксплантатов доброкачественных опухолей практически не отмечали различия с ОК в контроле (культивирование эксплантатов опухолей без ЛПК) (табл. 1, 2).

Действие аутологических ЛАК в отношении клеток злокачественных опухолей было хорошо выражено: у 2 больных отмечали деструкцию ОК; в остальных случаях противоопухолевое действие приводило к угнетению роста ОК по сравнению с контролем. Действие же ЛАК относительно доброкачественных

Рост эксплантатов злокачественных опухолей под влиянием ЛПК и ЛАК

Диагноз	Возраст больных, лет	Стадия заболевания	Противоопухолевое действие лимфоцитов		
			Рост эксплантатов (контроль)	Действие ЛПК	Действие ЛАК
Карцинома <i>in situ</i>	66	TisN0M0	Миграция единичных клеток	Миграция единичных клеток	Отсутствие миграции
Карцинома	68	T4N0M0	Миграция единичных клеток	Миграция единичных клеток	Отсутствие миграции; деструкция
Карцинома	52	T3N2M0	Монослой средней плотности	Отсутствие миграции	Отсутствие миграции
Карцинома	52	T3N2M0	Монослой средней плотности	Монослой низкой плотности	Отсутствие миграции
Карцинома	43	T2N1M0	Монослой средней плотности	Монослой низкой плотности	Монослой низкой плотности
Карцинома		T3N2M0	Монослой средней плотности	Отсутствие миграции	Отсутствие миграции; деструкция
Карцинома	54	T2N0M0	Монослой низкой плотности	Начальные этапы образования монослоя	Миграция единичных клеток
Карцинома	83	T3N0M0	Монослой средней плотности	Монослой средней плотности	Начальные этапы образования монослоя

Таблица 2

Рост эксплантатов доброкачественных опухолей под влиянием ЛПК и ЛАК

Диагноз	Возраст больных, лет	Противоопухолевое действие лимфоцитов		
		Рост эксплантатов (контроль)	Действие ЛПК	Действие ЛАК
Фиброзно-кистозная мастопатия	42	Начальные этапы образования монослоя	Начальные этапы образования монослоя	Начальные этапы образования монослоя
Макромастия	48	Рост клеток в диффузионных камерах отсутствует	Рост клеток в диффузионных камерах отсутствует	Рост клеток в диффузионных камерах отсутствует
Филоидная фиброаденома	40	Начальные этапы образования монослоя	Миграция единичных клеток	Миграция единичных клеток
Фиброаденома	24	Миграция единичных клеток	Миграция единичных клеток	Отсутствие миграции
Очаговый фиброаденоматоз	69	Монослой средней плотности	Монослой низкой плотности	Миграция единичных клеток
Фиброаденома	27	Миграция единичных клеток	Миграция единичных клеток	Миграция единичных клеток
Фиброаденома	32	Рост клеток в диффузионных камерах отсутствует	Рост клеток в диффузионных камерах отсутствует	Рост клеток в диффузионных камерах отсутствует
Фиброзно-кистозная мастопатия	41	Монослой низкой плотности	Начальные этапы образования монослоя	Миграция единичных клеток
Филоидная фиброаденома	51	Начальные этапы образования монослоя	Миграция единичных клеток	Миграция единичных клеток
Фиброаденома	29	Начальные этапы образования монослоя	Миграция единичных клеток	Миграция единичных клеток
Фиброаденома	36	Начальные этапы образования монослоя	Начальные этапы образования монослоя	Миграция единичных клеток
Папиллома с изъязвлениями	40	Начальные этапы образования монослоя	Начальные этапы образования монослоя	Миграция единичных клеток

клеток практически не отличалось от действия неактивированных ЛПК этих больных.

Суммируя полученные результаты можно констатировать, что противоопухолевое действие как неактивированных ЛПК, так и ЛАК проявляется активно только в отношении эксплантатов больных со злокачественными опухолями, в то время как относительно доброкачественных опухолей практически отсутствует.

Полученные нами данные о различном характере роста эксплантатов доброкачественных и злокачественных опухолей МЖ можно попытаться объяснить, используя данные литературы, которые отражают биологические характеристики клеток этих опухолей, в частности, особенности в экспрессии молекулярных маркеров. Изучение экспрессии молекул контроля клеточного цикла и TGF $\beta$  показало различие экспрессии этих маркеров клетками злокачественной опухоли по сравнению с клетками карциномы *in situ* и клетками доброкачественной опухоли МЖ [6]. Различия пролиферативных свойств клеток доброкачественных и злокачественных опухолей МЖ выявлены в системе *in vitro* при помощи люминисцентных методов. Отмечено, что уровень АТФ-люминесценции клеток злокачественной опухоли был значительно

выше по сравнению с клетками доброкачественной опухоли и нормальной тканью МЖ [7].

Более высокая противоопухолевая активность цитотоксических ЛПК больных со злокачественными опухолями совпадает с исследованиями других авторов, которые использовали иные субпопуляции клеток. Так, у пациентов со злокачественной опухолью МЖ активность естественных киллеров (ЕК) в отношении клеток линии K562 была значительно выше в сравнении с таковой больных с доброкачественными опухолями и здоровыми донорами [12, 13]. Отмечены различия функциональной активности цитотоксических клеток по отношению к доброкачественным и злокачественным ОК яичника, а также различия количественного характера между асцитной жидкостью и периферической кровью (ПК) больных со злокачественными опухолями яичника. При изучении субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ЕК Т-лимфоцитов и CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> ЕК ПК больных с доброкачественными и злокачественными опухолями яичника не установлены различия в количестве клеток. Однако разное количество этих клеток отмечали в асцитной жидкости и ПК больных раком яичника [14]. Различия отмечены при изучении метаболической активности еще одной популяции

клеток, способных к цитотоксическому действию — нейтрофилов ПК больных с доброкачественными и злокачественными опухолями яичника. У больных со злокачественными опухолями отмечали значительную активность нейтрофилов [15].

Наши данные согласуются также с исследованиями, в которых отмечена высокая цитотоксическая активность мононуклеаров ПК, активированных интерлейкином (ИЛ)-2, больных со злокачественными опухолями МЖ в отношении клеток линии MCF-7 (позитивная по рецепторам эстрогенов линия клеток МЖ). Подобной активности активированных мононуклеаров здоровых доноров не наблюдали [16]. Эти данные также могут быть использованы и при обсуждении результатов, полученных нами. Речь идет о том, что если в наших исследованиях изучали действие аутологических лимфоцитов в отношении доброкачественных и злокачественных ОК, то в предыдущей работе использовали лимфоциты больных со злокачественными опухолями и лимфоциты здоровых доноров. Возникает вопрос: почему в обоих исследованиях наиболее выраженный эффект связан с использованием ЛАК, полученных от больных? Такое действие ЛАК может быть обусловлено тем, что у больных со злокачественными опухолями лимфоциты преактивированы антигенами опухолей и активация ИЛ-2 существенно усиливает их противоопухолевое действие [17]. К этому следует добавить, что противоопухолевая активность ЛАК также может быть связана с усилением пролиферации лимфоцитов и продукцией цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, TNF $\alpha$ ) этими клетками, увеличением количества CD3 $^{+}$ -лимфоцитов и индукторных Т-хелперов. Действие ИЛ-2 приводит к повышению экспрессии нормальными киллерами молекул адгезии (CD18, CD54, CD58, CD56), что усиливает их взаимодействие с опухолевыми клетками-мишенями [18, 19].

Таким образом, результаты настоящих исследований и данные, полученные нами ранее, позволяют прийти к заключению, что изучение характера роста эксплантатов доброкачественных опухолей в сочетании с определением противоопухолевой активности аутологических лимфоцитов больных, могут быть важным прогностическим критерием малигнизации опухолей. Учет этих критериев, возможно в комплексе с другими показателями, может быть использован для формирования групп риска больных с доброкачественными заболеваниями МЖ, а следовательно дает основание выработать тактику наблюдения за указанными больными.

## ВЫВОДЫ

1. В характере роста эксплантатов злокачественных и доброкачественных опухолей МЖ выявлены существенные различия.

2. Активированные ИЛ-2 лимфоциты периферической крови больных с доброкачественными опухолями практически не обладают противоопухолевой активностью в отношении аутологических эксплантатов опухолей.

3. Действие аутологических ЛАК в отношении клеток злокачественных опухолей хорошо выражено.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Franek G, Wilczek B, Chłopecka H. The role of education in creating wholesome manners on the base of the programme concerning breast cancer prevention among women. *Wiad Lek* 2002; **55** (Supple 1, Pt 2): 673–8.
2. Reinier KS, Vacek PM, Geller BM. Risk factors for breast carcinoma in situ versus invasive breast cancer in a prospective study of pre- and post-menopausal women. *Breast Cancer Res Treat* 2007; **103** (3): 343–8.
3. Shin S, Schneider HB, Cole FJ Jr, et al. Follow-up recommendations for benign breast biopsies. *Breast J* 2006; **12** (5): 413–7.
4. Ben Hassouna J, Damak T, Ben Slama A, et al. Breast carcinoma arising within fibroadenomas. Report of four observations. *Tunis Med* 2007; **85** (10): 891–5.
5. Erbas B, Provenzano E, Armes J, et al. The natural history of ductal carcinoma in situ of the breast: a review. *Breast Cancer Res Treat* 2006; **97** (2): 135–44.
6. García-Tuñón I, Ricote M, Ruiz A, et al. Cell cycle control related proteins (p53, p21, and Rb) and transforming growth factor beta (TGFbeta) in benign and carcinomatous (in situ and infiltrating) human breast: implications in malignant transformations. *Cancer Invest* 2006; **24** (2): 119–25.
7. Loo WT, Tong JM, Cheung MN, et al. A new predictive and prognostic marker (ATP bioluminescence and positron emission tomography) in vivo and in vitro for delivering adjuvant treatment plan to invasive breast tumor patients. *Biomed Pharmacother* 2006; **60** (6): 285–8.
8. Papantoniou V, Tsiouris S, Koutsikos J, et al. Scintimammographic detection of usual ductal breast hyperplasia with increased proliferation rate at risk for malignancy. *Nucl Med Commun* 2006; **27** (11): 911–7.
9. Ioachim EE, Athanassiadou SE, Kamina S, et al. Matrix metalloproteinase expression in human breast cancer: an immunohistochemical study including correlation with cathepsin D, type IV collagen, laminin, fibronectin, EGFR, c-erbB-2 oncoprotein, p53, steroid receptors status and proliferative indices. *Anticancer Res* 1998; **18** (3A): 1665–70.
10. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 2008; **3** (9–10): 1172–84.
11. Яхимович ЛВ, Семенова-Кобзарь РА, Бережная НМ. Использование метода диффузионных камер для прогнозирования течения фиброаденоматоза. Информационное письмо, 1985. 12 с.
12. Wiltshcke C, Tyl E, Speiser P, et al. Increased natural killer cell activity correlates with low or negative expression of the HER-2/neu oncogene in patients with breast cancer. *Cancer* 1994; **73** (1): 135–9.
13. Andrianov IG, Dobkin AN, Kiselev OI, et al. Immunomodulating activity of natural killers in patients with breast tumors using vasopressin and interleukin 2 in vitro. *Vopr Onkol* 1989; **35** (10): 1186–91.
14. Lamkin DM, Lutgendorf SK, McGinn S, et al. Positive psychosocial factors and NKT cells in ovarian cancer patients. *Brain Behav Immun* 2008; **22** (1): 65–73.
15. Kondera-Anasz Z, Mielczarek-Palacz A, Switała J, et al. Metabolic activity of peripheral blood neutrophils in women with ovarian tumours. *Ginekol Pol* 2004; **75** (8): 609–14.
16. Kamamura Y, Takahashi K, Komaki K, et al. Effects of interferon-alpha and gamma on development of LAK activity from mononuclear cells in breast cancer patients. *J Med Invest* 1998; **45** (1–4): 71–5.
17. Бережная НМ, Горещкий БА. Интерлейкин-2 и злокачественные новообразования. Киев: Наук думка, 1992. 176 с.

18. Savas B, Kerr PE, Pross HF. Lymphokine-activated killer cell susceptibility and adhesion molecule expression of multidrug resistant breast carcinoma. *Cancer Cell Int* 2006; **6**: 24.

19. Ostanin AA, Chernykh HR, Leplina OY, *et al.* IL-2-activated killer cells and native cytokines in treatment of patients with advanced cancer. *Russ J Immunol* 1997; **2** (3–4): 167–76.

### THE FEATURES OF GROWTH OF THE BENIGN AND MALIGNANT BREAST TUMOR IN DIFFUSION CHAMBERS

*Y.D. Vinnichuk, O.B. Belova, E.A. Kirnasovskaya, V.I. Tarutinov, L.Y. Kovaleva, N.M. Berezhnaya*

**Summary.** *The growth of the tumor explants from the patients with benign and malignant breast cancer and antitumor activity of their autological peripheral blood lymphocytes were studied. The comparative analysis revealed differences in the growth of the tumor explants in diffusion chambers. The differences are displayed in the cell migration intensity from explants and in the*

*formation of monolayers with low and medium density. Antitumor efficiency of nonactivated PBL and activated by IL-2 peripheral blood lymphocytes from the patients with malignant was higher than ones from the patients with benign disease. The obtained data may be useful as an additional important criterion of mammary gland malignization.*

**Key Words:** mammary gland, benign disease and malignant breast tumor, lymphocytes, lymphokine activated killer cells.

**Адрес для переписки:**

Бережная Н.М.  
03022, Киев, ул. Васильковская, 45  
Институт экспериментальной патологии,  
онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого  
НАН Украины  
E-mail: berezh@onconet.kiev.ua