

Экспрессия мономорфных HLA-детерминант, трансферринового рецептора 1 (TfR1) при молекулярных подтипах рака молочной железы

С.В. Чулкова^{1,2}, Е.Н. Шолохова¹, И.В. Поддубная³, И.С. Стилиди^{1,2}, Н.Н. Тупицын¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. И.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Введение. В современной стратегии лечения рака широко используются иммуотропные препараты. Важное значение придается иммунологическим маркерам опухоли, которые определяют прогноз заболевания, эффективность лечения. Поэтому изучение их экспрессии является одним из ведущих научных направлений. Особый интерес представляет изучение мономорфных HLA-детерминант, трансферринового рецептора 1 (TfR1) в зависимости от биологического подтипа рака молочной железы.

Цель исследования – оценить экспрессию молекул HLA I, II классов, TfR1 клетками рака молочной железы и определить их взаимосвязь с молекулярно-биологическим подтипом опухоли.

Материалы и методы. В данную работу включены 120 больных раком молочной железы, которые получали лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Преобладали больные со II и III стадиями опухоли: 56,7 % и 33,4 % соответственно. Чаще отмечалась умеренная степень дифференцировки (G₂). Люминальный подтип составил 47,5 % (n = 57), нелюминальный – 52,5 % (n = 50). Иммунофенотипирование первичной опухоли выполнено методом иммунофлуоресценции на криостатных срезах. Оценка реакции проводилась с помощью люминесцентного микроскопа ZEISS Axioscope 5 (Zeiss AG, Германия). Изучена частота экспрессии молекул HLA I класса, HLA-DR, TfR1, инфильтрация опухоли CD45⁺, CD38⁺-клетками в зависимости от молекулярного подтипа рака молочной железы.

Результаты. Установлено, что частота экспрессии мономорфных детерминант HLA I класса при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы была сопоставима; HLA-DR-антиген экспрессировался достоверно чаще при люминальном подтипе рака молочной железы: 37,3 % и 18,0 % соответственно, p = 0,022. Частота экспрессии TfR1 была достоверно выше при люминальном подтипе рака по сравнению с нелюминальным, p = 0,014. Преимущественно отмечался мономорфный тип реакции – в 76,5 % случаев (n = 39). Мозаичный тип реакции TfR1 отмечен в 7,8 % образцов. При нелюминальном раке мономорфная экспрессия TfR1 выявлена в 50,0 % случаев (n = 30), а мозаичная экспрессия – в 20,0 % (n = 12). Установлена выраженная степень лимфоидной инфильтрации, в частности плазмочитарной, при нелюминальном подтипе рака молочной железы: 70,7 % (n = 29) и 35,0 % (n = 14) при нелюминальном и люминальном подтипах соответственно, p = 0,001. Отмечена ассоциация экспрессии молекул HLA I класса с выраженностью общеилекоцитарной инфильтрации, p = 0,007.

Заключение. Частота экспрессии мономорфных детерминант HLA I класса не различалась при молекулярных подтипах рака молочной железы. Экспрессия молекул HLA II класса достоверно чаще наблюдалась при люминальном подтипе рака молочной железы. Экспрессия мономорфных детерминант HLA I класса связана со степенью лимфоидной инфильтрации опухоли. При нелюминальном подтипе плазмочитарная инфильтрация более выражена. Экспрессия трансферриновых рецепторов достоверно более выражена при люминальном подтипе.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммунофенотипирование, иммунофлуоресценция, HLA I класса, HLA-DR, TfR1, CD45, CD38, криостатные срезы

Для цитирования: Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Поддубная И.В. и др. Экспрессия мономорфных HLA-детерминант, трансферринового рецептора 1 (TfR1) при молекулярных подтипах рака молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):50–61. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-50-61

Expression of monomorphic HLA-determinants, transferrin receptor 1 (TfR1) in molecular subtypes of breast cancer

Svetlana V. Chulkova^{1,2}, Elena N. Sholokhova¹, Irina V. Poddubnaya³, Ivan S. Styldi^{1,2}, Nikolay N. Tupitsyn¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, 115522 Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1a Ostrovityanova St., 117997 Moscow, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barrikadnaya St., 125993 Moscow, Russia

Contacts: Svetlana Vasilievna Chulkova chulkova@mail.ru

Background. Immunotropic drugs are widely used in the modern strategy of cancer treatment. Importance is given to immunological markers of the tumor, which determine the prognosis of the disease, the effectiveness of treatment. Therefore, the study of their expression is one of the leading scientific directions. Of particular interest is the study of monomorphic HLA determinants, transferrin receptor 1 (TfR1), depending on its biological subtype of breast cancer.

Aim. To evaluate the frequency of expression of HLA class I, II, TfR1 molecules by breast cancer cells and determine their relationship with the molecular biological subtype of the tumor.

Materials and methods. This study included 120 patients with breast cancer who received treatment at the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia. Tumor stages II and III prevailed: 56.7 % and 33.4 %, respectively. A moderate degree of differentiation (G₂) was more often noted. The luminal subtype was 58.3 % (n = 70), non-luminal – in 41.7 % (n = 50). Immunophenotyping of the primary tumor was performed by immunofluorescence on cryostat sections. The reaction was evaluated using a ZEISS AxioScope 5 luminescent microscope (Zeiss AG, Germany). The frequency of expression of HLA class I and II molecules were studied depending on the clinical and morphological characteristics of breast cancer. The frequency of expression of HLA class I, HLA-DR, TfR1, molecules, tumor infiltration of CD45⁺, CD38⁺, depending on the molecular subtype of breast cancer was studied.

Results. It was found that the frequency of expression of monomorphic determinants of the HLA class I in luminal and non-luminal subtypes of breast cancer was comparable; HLA-DR was expressed significantly more often in the luminal subtype of breast cancer: 37.3 % and 18.0 %, respectively, $p = 0.022$. The frequency of TfR1 expression was significantly higher in the luminal subtype of cancer compared to non-luminal, $p = 0.014$. Predominantly monomorphic type of reaction was observed: in 76.5 % (n = 39) of cases. The mosaic type of the TfR1 reaction was noted in 7.8 % of the samples. TfR1 monomorphic expression was detected in 50.0 % (n = 30) of cases in non-luminal cancer, the mosaic expression – in 20.0 % (n = 12) of cases. A pronounced degree of lymphoid infiltration, in particular plasmacytic, was established in non-luminal subtype of breast cancer: 70.7 % (n = 29) and 35.0 % (n = 14), respectively, $p = 0.001$. An association was noted between the expression of HLA I class molecules and the severity of general leukocyte infiltration, $p = 0.007$.

Conclusion. The frequency of expression of HLA class I monomorphic determinants did not differ in molecular subtypes of breast cancer. The expression of the HLA class II molecule was significantly more frequently observed in the luminal subtype of breast cancer. The expression of HLA class I monomorphic determinants is associated with the degree of lymphoid infiltration of the tumor. In the non-luminal subtype, plasmacytic infiltration is more pronounced. The expression of transferrin receptors is significantly more pronounced in the luminal subtype.

Keywords: breast cancer, immunophenotyping, HLA class I, HLA-DR, TfR1, CD45, CD38 immunofluorescence, cryostat sections

For citation: Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Poddubnaya I.V. et al. Expression of monomorphic HLA-determinants, transferrin receptor 1 (TfR1) in molecular subtypes of breast cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(4):50–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-50-61

Введение

В структуре онкологической заболеваемости женщин в России рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным. Ежегодно в мире выявляется не менее 1,5 млн новых случаев РМЖ [1]. Согласно статистическим данным, от этой болезни в мире погибает почти 700 тыс. женщин ежегодно [2].

Рак молочной железы — весьма гетерогенная опухоль, имеющая разные биологические подтипы

в зависимости от экспрессии на клеточной поверхности тех или иных молекул и отличающаяся разнообразными течением и ответом на лекарственную терапию [3, 4]. Вместе с тем немаловажное значение имеют иммунофенотипические характеристики опухоли. Исследования последних лет позволили раскрыть некоторые иммунологические особенности РМЖ, провести параллели с клиническим течением данного заболевания, объяснить

неудачи в лекарственной терапии, определить новые маркеры прогноза.

При РМЖ широко и детально изучаются мономорфные HLA-детерминанты. Они являются, пожалуй, ключевыми в реализации противоопухолевого иммунного ответа при раке, специализируясь на распознавании и представлении собственных и чужеродных пептидов, обеспечивая Т-клеточный ответ [5]. Лабораторией иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России за годы исследований накоплен довольно обширный материал по изучению их значимости при РМЖ. Установлено наличие взаимосвязи экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II классов клетками РМЖ между собой [6]. Сформулирована концепция, объясняющая механизм влияния мономорфных HLA-детерминант на прогноз заболевания. Реализация влияния HLA-фенотипа происходит опосредованно, через действие иммунной системы в иммунокомпетентном организме [6]. В последующих исследованиях лаборатории дополнительно изучались такие аспекты, как связь экспрессии молекул гистосовместимости с эффективностью лекарственного лечения, их взаимоотношение с местными иммунными реакциями [7, 8].

Трансферриновые рецепторы 1 (TfR1), известные как кластер дифференцировки 71 (CD71), обеспечивают транспорт железа через клеточную мембрану, способствуя пролиферативной активности клеток [6]. Гиперэкспрессия TfR1 выявлена при многих видах солидных опухолей, таких как рак почки, пищевода, холангиокарцинома, рак молочной железы, глиобластома [9–13]. Их клиническое значение широко изучается. Показано, что гиперэкспрессия TfR1 клетками РМЖ связана с ухудшением показателей выживаемости [6]. Экспрессирующие TfR1 клетки обнаружены среди радиорезистентной популяции при некоторых видах злокачественных опухолей (глиома, рак шейки матки) [14, 15]. Вместе с тем некоторые исследования указывают на существование слабо экспрессирующих TfR1 клеток рака, которые могут обладать потенциалом к инвазии и миграции [16].

Таким образом, изучение экспрессии мономорфных HLA-детерминант, TfR1 клетками РМЖ является необходимым этапом для понимания клинического поведения опухоли, для совершенствования стратегий лекарственного лечения. Особый интерес представляет изучение их экспрессии в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ, этому вопросу и посвящено данное исследование.

Цель исследования — оценить экспрессию молекул HLA I, II классов, TfR1 клетками рака молочной железы и определить их взаимосвязь с молекулярно-биологическим подтипом опухоли.

Материалы и методы

Дизайн исследования. Проведено ретроспективное когортное исследование. Критерии включения: первично-операбельный РМЖ, отсутствие лекарственного лечения в анамнезе, стадии заболевания I–IIIС.

Участники (объекты) исследования. Материалом данного исследования послужили образцы опухолевой ткани больных РМЖ. Всего включены в работу 120 больных РМЖ, которые были обследованы и получили лечение в условиях ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Возраст больных варьировал от 27 до 77 лет, средний возраст составил $54,5 \pm 0,9$ года. Диагноз РМЖ был установлен на основании клинических, рентгенологических и морфологических данных. Всем пациенткам выполнено хирургическое лечение: в объеме мастэктомии — 61,7 % ($n = 74$), резекции молочной железы — 38,3 % ($n = 46$). Лекарственную терапию в адъювантном режиме получили 69,2 % пациенток ($n = 83$), в неoadъювантном — 25,8 % ($n = 31$). Лучевая терапия проведена в 44,2 % случаев ($n = 53$), гормонотерапия — в 56,6 % ($n = 68$).

Методы оценки целевых показателей. Распространенность опухолевого процесса оценивалась в соответствии с клинической классификацией и международной системой TNM (7-е издание). По стадиям больные распределились следующим образом: I стадия — 10,0 % случаев, IIА стадия — 14,2 %, IIВ — 42,5 %, IIIА — 12,5 %, IIIВ — 14,2 %, IIIС — 6,7 % (табл. 1).

Таблица 1. Распределение больных в зависимости от стадии рака молочной железы

Table 1. Distribution of patients depending on the stage of breast cancer

Стадия Stage	<i>n</i>	%
I	12	10,0
IIА	17	14,2
II В	51	42,5
III А	15	12,5
III В	17	14,2
III С	8	6,7
Всего Total	120	100,0

В большинстве случаев размер первичной опухоли соответствовал категории Т2 (63,3 %, $n = 76$), реже отмечались стадии Т1 (18,3 %, $n = 22$) и Т4 (15,0 %, $n = 18$), стадия Т3 выявлена у меньшего числа больных (3,3 %, $n = 4$). Метастатическое поражение лимфоузлов (N+) наблюдалось почти у всех больных — в 80 % случаев ($n = 96$): N1 — 55,0 % ($n = 66$), N2 — 18,3 %

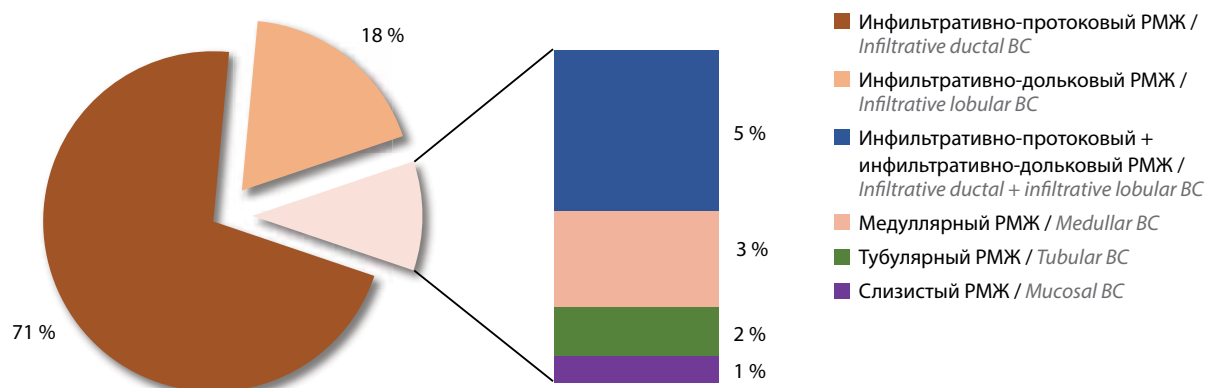


Рис. 1. Распределение больных в зависимости от гистологического типа рака молочной железы (РМЖ)

Fig. 1. Distribution of patients depending on the histological type of breast cancer (BC)

($n = 22$), N3 – 6,7 % ($n = 8$). Чаще всего степень дифференцировки опухоли соответствовала G₂ (67,5 %, $n = 81$).

В соответствии с данными патоморфологического исследования в большинстве случаев диагностирован инфильтративно-протоковый РМЖ – 71 % больных ($n = 85$); инфильтративно-дольковый рак отмечен в 18 % случаев ($n = 22$), другие виды – в 11 % ($n = 13$) (рис. 1).

Экспрессия опухолевыми клетками рецепторов к эстрогенам наблюдалась в 47 % образцов ($n = 57$), рецепторов к прогестерону – в 45 % образцов ($n = 54$). Ввиду ретроспективного характера анализа разделение на молекулярно-биологические подтипы РМЖ нами выполнено на основании экспрессии рецепторов к эстрогенам. Опухоли, экспрессирующие рецепторы к эстрогену, классифицировались как люминальный подтип РМЖ. При отсутствии экспрессии таковых опухолей, соответственно, относились к нелюминальному подтипу. Таким образом, РМЖ в 47,5 % случаев ($n = 57$) классифицирован как люминальный, а в 52,5 % случаев ($n = 63$) – как нелюминальный подтип.

Иммунофенотипирование опухоли выполнено на криостатных срезах в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» методом иммунофлуоресценции. Криостатные срезы фиксировали ацетоном на предметных стеклах в течение 10 мин при температуре 4 °С. После фиксации срезы отмывали в среде 199 (pH 7,2–7,4), наносили моноклональные антитела и инкубировали в течение 30 мин. После отмывания наносили FITC-меченные F (ab) 2-фрагменты антивидовых IgG1. По окончании инкубации препараты отмывали и консервировали 50 % раствором глицерина. Учет реакции выполняли на люминесцентном микроскопе ZEISS Axioscope 5 (Zeiss AG, Германия).

Изучена экспрессия опухолевыми клетками пан-цитокератина (KL-1), молекул главного комплекса

гистосовместимости HLA I класса, HLA-DR, Tfr1; оценены общелейкоцитарная инфильтрация (CD45), плазмоцитарная инфильтрация (CD38) (табл. 2). Положительными считали клетки, имеющие мембранное свечение разной степени интенсивности (от слабой до выраженной), а также клетки с цитоплазматическим свечением. Оценка реакции на опухолевых клетках проводилась полуколичественным методом, предложенным Hammerling и соавт. (1987): 1) отрицательная

Таблица 2. Моноклональные антитела, использованные в работе

Table 2. Monoclonal antibodies used in the work

Антитело Antibody	Клон Clone	Производитель Manufacturer
HLA-DR	LN3	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)
HLA I класса HLA class I	W6/32	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)
CD71	Mouse BALB/c IgG2a	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)
KL-1	—	Immunotech, Marseille (Франция) Immunotech, Marseille (France)
CD45	H130	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)
CD38	HIT2	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)
F (ab) 2-фрагменты, меченные FITC FF (ab) 2-fragments, labeled FITC	M1-14D12	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)

Таблица 3. Экспрессия опухолевыми клетками молекул HLA I класса, HLA-DR

Table 3. HLA class I, HLA-DR expression by tumor cells

Экспрессия HLA I класса HLA I class expression		Экспрессия HLA-DR HLA-DR expression			Всего Total
		отсутствует absent	мозаичная mosaic	мономорфная monomorphic	
Отсутствует Absent	n	43	5	0	48
	%	89,6	10,4	0,0	100,0
Мозаичная Mosaic	n	11	2	2	15
	%	73,3	13,3	13,3	100,0
Мономорфная Monomorphic	n	26	10	11	47
	%	55,3	21,3	23,4	100,0
Всего Total	n	80	17	13	110
	%	72,7	15,5	11,8	100,0

реакция — менее 10 % антигенположительных клеток; 2) мозаичная реакция — антиген экспрессируется частью опухолевых клеток (10–80 %); 3) мономорфная реакция — экспрессия анализируемого антигена наблюдается более чем в 80 % опухолевых клеток.

Оценка экспрессии антигенов на гемопоэтических клетках выполнена также полуколичественным методом. При наличии единичных антигенположительных клеток в поле зрения изучаемого препарата реакция оценивалась как слабая инфильтрация, при наличии в препарате антигенположительных клеток в виде отдельных групп — как умеренная инфильтрация. Если наблюдались скопления (очаги) антигенположительных клеток в срезе, крупные группы и инфильтраты из этих клеток, то реакция оценивалась как выраженная инфильтрация.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM-SPSS Statistics v. 21. Осуществляли анализ корреляций по Пирсону или Спирмену, подсчет распределения частот по категориям с непрерывными и дискретными переменными (критерий Фишера и χ^2 по Пирсону). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты анализа экспрессии молекул HLA I класса, HLA-DR клетками РМЖ представлены в табл. 3. В целом по группе в 40 % образцов ($n = 48$) HLA I класса не экспрессировались. В аналогичном числе (%) случаев выявлена мономорфная экспрессия анализируемого антигена. В отношении молекулы HLA-DR наблюдалась несколько иная картина. Мономорфная экспрессия HLA-DR отмечена в 13 % образцов ($n = 13$). Преимущественно опухоли

были антигенотрицательными — 68,3 % ($n = 82$). Мозаичная экспрессия данного антигена опухолевыми клетками установлена в 12,0 % образцов ($n = 9$). Как видим, частота экспрессии молекул HLA I и II классов различалась.

При анализе взаимосвязи экспрессии обеих HLA-детерминант отмечено следующее. Мономорфная экспрессия обеих детерминант выявлена в 23,4 % случаев. Значительно чаще наблюдалось отсутствие экспрессии обеих молекул главного комплекса гистосовместимости I и II класса: 89,6 % образцов. HLA I-отрицательные опухоли в небольшом числе случаев (10,4 %) мозаично экспрессировали молекулы HLA II класса. Мозаичная экспрессия антигена HLA I класса зачастую сопровождалась отсутствием экспрессии молекул HLA II класса. Среди опухолей с мономорфной экспрессией HLA I класса 23,4 % характеризовались мономорфной, а 21,3 % — мозаичной экспрессией молекул HLA II класса. Полученные результаты в отношении экспрессии мономорфных детерминант I и II класса согласуются с данными литературы [6, 7, 17, 18]. Пример экспрессии HLA-мономорфных детерминант представлен на рис. 2.

Далее нами была изучена экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости при 2 подтипах РМЖ — люминальном и нелюминальном. Данные анализа представлены в табл. 4. Как видно из таблицы, при люминальном и нелюминальном подтипах РМЖ частота экспрессии HLA I класса была сопоставима. В отношении молекулы HLA-DR получены несколько иные данные. При люминальном подтипе данный антиген экспрессировался чаще, чем при нелюминальном: мозаичный тип реакции отмечен

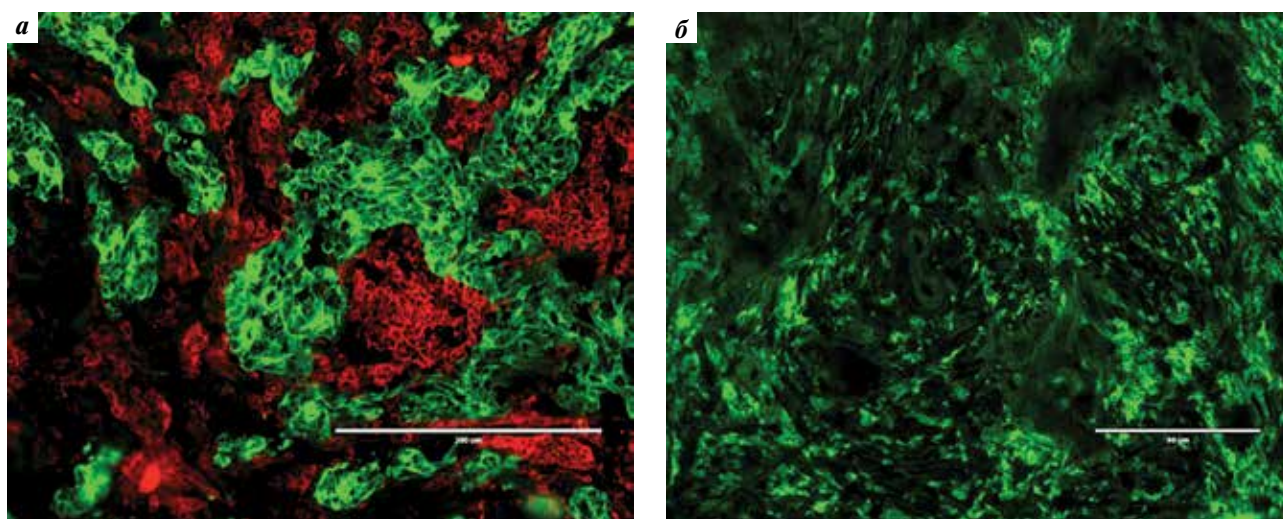


Рис. 2. Типы экспрессии молекул HLA клетками рака молочной железы ($\times 400$): а – мономорфная реакция (более 80 % опухолевых клеток экспрессируют антиген); б – мозаичная реакция (10–80 % опухолевых клеток экспрессируют антиген)

Fig. 2. Types of HLA expression by breast cancer cells ($\times 400$): а – monomorphic reaction (more than 80 % of tumor cells express antigen); б – mosaic reaction (10–80 % of tumor cells express antigen)

Таблица 4. Типы экспрессии опухолевыми клетками молекул HLA I класса, HLA-DR в зависимости подтипа рака молочной железы

Table 4. Types of expression of HLA class I, HLA-DR molecules by tumor cells depending on the subtype of breast cancer

Подтип рака молочной железы Breast cancer subtype		Экспрессия HLA HLA expression			Всего Total
		отсутствует absent	мозаичная mosaic	мономорфная monomorphic	
HLA I класса HLA class I					
Люминальный Luminal	n	21	9	22	52
	%	40,4	17,3	42,3	100,0
Нелюминальный Non-luminal	n	27	6	26	59
	%	45,8	10,2	44,1	100,0
HLA-DR*					
Люминальный Luminal	n	32	12	7	51
	%	62,7	23,5	13,7	100,0
Нелюминальный Non-luminal	n	50	5	6	61
	%	82,0	8,2	9,8	100,0

* $p = 0,047$.

в 23,5 % случаев, а в 13,7 % случаев – мономорфный тип. При нелюминальном подтипе клетки РМЖ слабо экспрессировали молекулы HLA II класса.

Распределение HLA-DR-антигенотрицательных и антигенположительных опухолей в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ представлено на рис. 3.

Как видим, существует разница в экспрессии молекул HLA-DR: при люминальном подтипе антиген экспрессировался в 37,3 %, а при нелюминальном – в 18,0 % наблюдений, $p = 0,022$. Возможно, такое различие обусловлено преобладанием при нелюминальном подтипе менее дифференцированных опухолей.

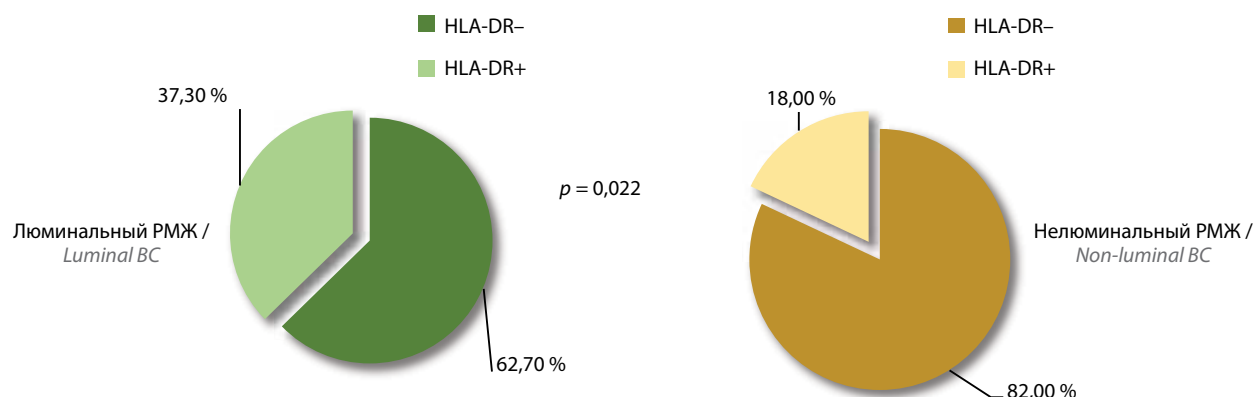


Рис. 3. Частота экспрессии молекулы HLA-DR при люминальном и нелюминальном раке молочной железы (РМЖ)

Fig. 3. Frequency of expression of the HLA-DR molecule in luminal and non-luminal breast cancer (BC)

Известно, что при нарастании степени злокачественности РМЖ экспрессия молекул HLA-DR наблюдается реже [7, 8, 17].

По данным литературы, при разных биологических подтипах РМЖ могут наблюдаться различия в экспрессии молекул HLA I класса [17, 18]. В своей работе B.V. Sinn и соавт. отмечают, что у больных с трижды негативным раком по сравнению с другими подтипами выше частота экспрессии молекул HLA I класса. Кроме того, экспрессия данного антигена чаще наблюдалась у пациентов с поражением лимфатических узлов и при опухолях с низкой дифференцировкой (G_3) [17]. Авторы указывают, что экспрессия молекул HLA I класса связана с лучшим ответом на химиотерапию гормоноположительного РМЖ [17]. На основании этих данных мы предполагаем, что в нашей выборке доля трижды негативного рака среди группы нелюминальных опухолей была небольшой. Это обстоятельство может объяснить результаты схожей частоты экспрессии молекул HLA I класса.

Следующим этапом работы стал анализ экспрессии Tfr1 (CD71). В целом по группе экспрессия Tfr1 наблюдалась в подавляющем числе анализируемых образцов, что составило 76,6 % ($n = 85$). При этом в 62,2 % случаев ($n = 69$) опухоли характеризовались мономорфной экспрессией. Мозаичная экспрессия Tfr1 установлена в 14,4 % образцов ($n = 16$).

Результаты изучения экспрессии Tfr1 (CD71) в зависимости от подтипа РМЖ представлены в табл. 5. Как можно видеть из таблицы, при люминальном подтипе частота экспрессии изучаемого антигена достоверно выше, чем при нелюминальном. Выраженность экспрессии антигена Tfr1 при каждом из подтипов варьировала. Оказалось, что клетки люминального РМЖ экспрессируют Tfr1 преимущественно мономорфно, что отмечено в 76,5 % случаев ($n = 39$). Мозаичный тип реакции антигена Tfr1 от-

мечен в 7,8 % образцов. При нелюминальном раке мономорфная экспрессия Tfr1 выявлена в 50,0 % случаев ($n = 30$), а мозаично экспрессировался данный антиген в 20,0 % случаев ($n = 12$). Признаки достоверно взаимосвязаны, $p = 0,014$.

Известно, что рецепторы трансферрина обеспечивают транспорт железа через клеточную мембрану [19]. Железо необходимо для многих клеточных процессов, в том числе для синтеза ДНК и, соответственно, для клеточной пролиферации. Из-за высокой пролиферативной активности клеток злокачественной опухоли отмечается повышенная экспрессия Tfr1 [19–22]. Полученные нами результаты в отношении рецептора Tfr1 хорошо согласуются с данными литературы: гиперэкспрессия Tfr1 отмечается в большинстве образцов РМЖ. При этом следует обратить внимание, что люминальный РМЖ экспрессирует Tfr1 преимущественно мономорфно. По данным исследований, гиперэкспрессия Tfr1 при люминальном раке ассоциируется с выраженной пролиферативной активностью опухоли, более низкой экспрессией рецепторов к стероидным гормонам, экспрессией белка HER2/neu, а также с плохим прогнозом [6, 10]. Опираясь на эти данные, можно заключить, что в анализируемой нами выборке немалую долю, вероятно, составляет люминальный В подтип РМЖ, течение которого, как известно, схоже с течением трижды негативного подтипа.

Далее мы провели оценку выраженности общей лимфоидной инфильтрации на основании количества CD45⁺-лимфоцитов в опухолевых срезах. Мы не обнаружили достоверной разницы в степени инфильтрации опухоли CD45⁺-клетками в зависимости от подтипа РМЖ. Однако считаем важным отметить, что при нелюминальном подтипе выраженная степень CD45-инфильтрации наблюдалась чаще, чем при люминальном подтипе: 49,2 % против 32,7 % (табл. 6).

Таблица 5. Экспрессия трансферринового рецептора (CD71) при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы ($p = 0,014$)
Table 5. Transferrin receptor (CD71) expression in luminal and non-luminal subtypes of breast cancer ($p = 0,014$)

Подтип рака молочной железы Breast cancer subtype		Экспрессия CD71 CD71 expression			Всего Total
		отсутствует absent	мозаичная mosaic	мономорфная monomorphic	
Люминальный Luminal	<i>n</i>	8	4	39	51
	%	15,7	7,8	76,5	100,0
Нелюминальный Non-luminal	<i>n</i>	18	12	30	60
	%	30,0	20,0	50,0	100,0
Всего Total	<i>n</i>	26	16	69	111
	%	23,4	14,4	62,2	100,0

Таблица 6. Инфильтрация CD45⁺-клетками при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы ($p = 0,205$)
Table 6. CD45⁺ infiltration in luminal and non-luminal breast cancer subtypes ($p = 0,205$)

Подтип рака молочной железы Breast cancer subtype		Инфильтрация CD45 CD45 infiltration			Всего Total
		слабая weak	умеренная moderate	выраженная expressed	
Люминальный Luminal	<i>n</i>	18	17	17	52
	%	34,6	32,7	32,7	100,0
Нелюминальный Non-luminal	<i>n</i>	16	15	30	61
	%	26,2	24,6	49,2	100,0
Всего Total	<i>n</i>	34	32	47	113
	%	30,1	28,3	41,6	100,0

Кроме того, изучая плазмоцитарную инфильтрацию, мы установили, что инфильтрация CD38⁺-клетками в зависимости от подтипа РМЖ различалась. При нелюминальном подтипе РМЖ плазмоцитарная инфильтрация была более выражена, что наблюдалось в виде мозаичной реакции в 70,7 % случаев ($n = 29$), тогда как при люминальном подтипе — только в 35,0 % случаев ($n = 14$). Признаки были достоверно взаимосвязаны, $p = 0,001$ (рис. 4).

Известно, что выраженная инфильтрация опухоли лимфоцитами наблюдается при трижды негативном РМЖ, который, по последним научным данным, характеризуется более частыми экспрессией PD-L1 и ответом на иммунотерапию [23]. На рис. 5 представлен пример выраженной лимфоидной инфильтрации.

Иной характер иммунных реакций отмечен при люминальном РМЖ, который по сравнению с другими подтипами характеризуется более слабой

лимфоидной инфильтрацией и, кроме того, низкой экспрессией PD-L1, что ассоциируется с резистентностью к иммунотерапии [24, 25].

В рамках обсуждения полученных результатов, считаем уместным обратить внимание на то, что, по данным литературы, имеется связь лимфоидной инфильтрации с экспрессией молекул HLA I класса. В частности, об этом сообщают B.V. Sinn и соавт.: в проведенном ими исследовании выраженная экспрессия молекул HLA I класса была ассоциирована с лимфоидной инфильтрацией опухоли [17]. Такая взаимосвязь установлена также в отношении гормонально-положительного HER2-отрицательного РМЖ [17]. A.F. De Groot и соавт. указывают, что преимущество лимфоидной инфильтрации проявляется именно в случаях экспрессии клетками рака молекул HLA I класса: при неoadъювантной химиотерапии в таких опухолях чаще наблюдался полный патоморфологический ответ [26].

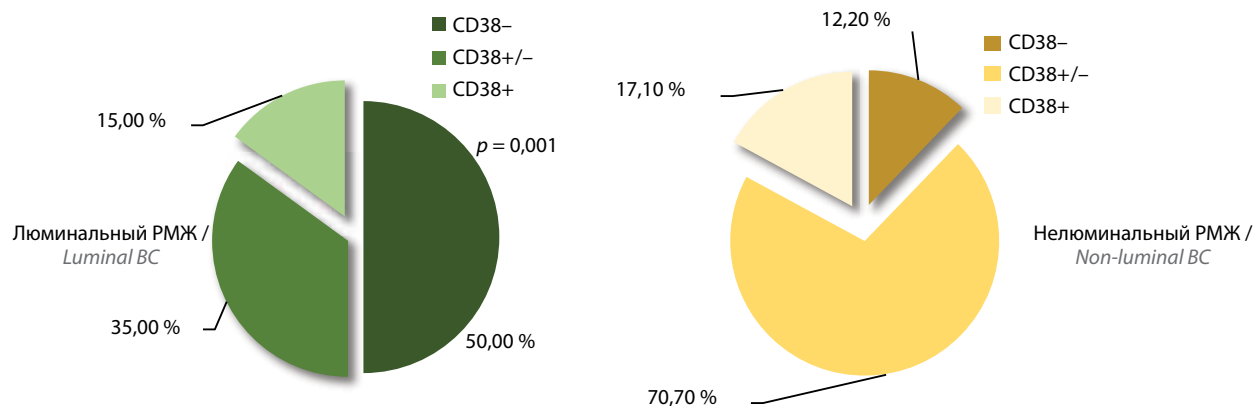


Рис. 4. Инфильтрация CD38⁺-клетками при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы (РМЖ)

Fig. 4. Infiltration of CD38⁺ cells in luminal and non-luminal subtypes of breast cancer (BC)

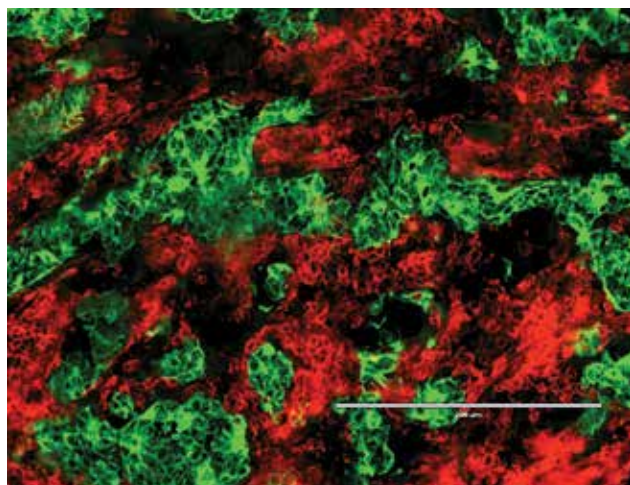


Рис. 5. Инфильтрация опухоли CD45⁺-клетками ($\times 400$): экспрессия KL-1 клетками рака молочной железы — зеленый цвет; лимфоидная инфильтрация (CD45) опухоли — красный цвет

Fig. 5. CD45⁺ infiltration of tumor ($\times 400$): KL-1 expression by breast cancer cells — in green; lymphoid infiltration (CD45) of tumor — in red

В своей работе мы также оценили взаимоотношение лимфоидной инфильтрации с экспрессией молекул HLA I класса. Анализ выполнен в пределах всей когорты больных. Установлена ассоциация экспрессии данного антигена с выраженностью общей лейкоцитарной инфильтрации. В 70,2 % антиген-положительных опухолей отмечена выраженная инфильтрация CD45⁺-клетками (табл. 7). В антиген-отрицательных опухолях такая степень инфильтрации отмечена в меньшем числе наблюдений — 30,0 %. Признаки достоверно взаимосвязаны, $p = 0,007$. При детальном анализе обнаружено, что при мономорфной экспрессии антигенов HLA I класса уровень CD45⁺-инфильтрации выше, чем при мозаичной: 53,3 % (26/47) против 14,9 % (7/47), $p = 0,029$. Результаты проведенного анализа убедительно подтверждают данные литературы и полученные в более ранних работах нашей лаборатории данные [6, 17, 27].

Таким образом, в ходе работы установлено, что частота экспрессии мономорфных детерминант

Таблица 7. CD45-инфильтрация и экспрессия HLA класса I

Table 7. CD45 infiltration and HLA class I expression

CD 45-инфильтрация CD45 infiltration		Экспрессия HLA I класса HLA class I expression		Всего Total
		HLA I–	HLA I+	
Слабая Weak	n	22	12	34
	%	64,7	35,3	100,0
Умеренная Moderate	n	12	18	30
	%	40,0	60,0	100,0
Выраженная Expressed	n	14	33	47
	%	29,8	70,2	100,0

HLA I класса при люминальном и нелюминальном подтипах РМЖ была сопоставима. Как отмечено выше, по данным ряда источников, при разных биологических подтипах РМЖ возможны различия в экспрессии молекул HLA I класса [17, 18]. Например, как сообщают B.V. Sinn и соавт., более высокая частота экспрессии молекул HLA I класса наблюдается у больных с трижды негативным раком. Кроме того, экспрессия данного антигена чаще наблюдалась у пациентов с поражением лимфатических узлов и в опухолях с низкой дифференцировкой (G3) [17].

Это позволило нам предположить, что доля трижды негативного рака среди группы нелюминальных опухолей в нашем исследовании была невелика, что вполне объясняет результаты схожей частоты экспрессии молекул HLA I класса.

Иная картина наблюдалась в отношении молекулы HLA-DR: антиген экспрессировался достоверно чаще при люминальном подтипе РМЖ. Нельзя исключить, что причиной тому может быть преобладание в группе нелюминального рака менее дифференцированных опухолей. Показано, что молекулы HLA-DR экспрессируются реже при нарастании степени злокачественности рака молочной железы [7, 8, 17].

Результаты анализа экспрессии Tfr1 показали, что ее частота достоверно выше при люминальном подтипе рака по сравнению с нелюминальным. Преимущественно отмечался мономорфный тип реакции. Полученные нами результаты убедительно свидетельствуют о высокой пролиферативной активности клеток данного подтипа РМЖ. Исходя из имеющихся в литературе сведений о том, что гиперэкспрессия Tfr1 при люминальном раке ассоциирована с выраженной пролиферативной активностью опухоли, более низкой экспрессией рецепторов к стероидным гормонам и гиперэкспрессией HER2/neu [9, 10], полагаем, можно заключить, что в когорте больных нашего исследования немалую долю составляет люминальный В подтип РМЖ, течение которого схоже с течением трижды негативного подтипа. Дополнительно следует сообщить, что Н.О. Nabashy и соавт., проведя многофакторный анализ, установили, что экспрессия Tfr1 являлась независимым прогностическим фактором при люминальном РМЖ, характеризующимся резистентностью к тамоксифену [10]. Принимая во внимание эти данные, Tfr1, по-видимому, могут рассматриваться как маркер высокопролиферативного пула клеток гормонорезистентного РМЖ. И в этом плане правомерно предположить возможное существование подгруппы люминального В подтипа РМЖ с вышеуказанными характеристиками [10].

Дополнительно, необходимо отметить, что некоторые экспериментальные и клинические исследования продемонстрировали выраженное противоопухолевое действие нацеленных на Tfr1 антител [28, 29]. Вероятно, Tfr1 может рассматриваться как потенциальная молекулярная мишень не только для диагностики, но и для иммунотерапии рака, поскольку экспрессия Tfr1 может быть связана с иммунным микроокружением и посредством регуляции экспрессии PD-L1 влиять на противоопухолевый иммунный ответ [30].

В нашем исследовании установлена выраженная степень лимфоидной инфильтрации, в частности плазмочитарной, при нелюминальном подтипе РМЖ. Выявлена ассоциация экспрессии молекул HLA I класса с выраженностью общелейкоцитарной инфильтрации, что вполне согласуется с данными литературы [17, 26]. Как отмечено выше, выраженная инфильтрация опухоли лимфоцитами наблюдается при трижды негативном РМЖ. Это, вероятно, может объяснить полученные при нелюминальном подтипе результаты.

Об инфильтрации опухоли мононуклеарными клетками (лимфоциты, макрофаги) известно давно, хорошо изучены многие аспекты. Хотелось бы обратить внимание на то, что иммунофенотип опухоли может быть связан с характером интратуморальных иммунных реакций. Так, показано, что HLA-DR-отрицательный РМЖ характеризовался сниженным содержанием активированных интратуморальных Т-лимфоцитов, имел хуже прогноз и ответ на лечение [7, 31]. Опухоли с таким иммунофенотипом в нашем исследовании чаще наблюдались при нелюминальном подтипе РМЖ. В этом отношении определение иммунофенотипических характеристик РМЖ может дополнять картину молекулярного подтипа. Это могло бы позволить стратифицировать больных на группы с целью изучения иммунотерапии: высокую вероятность ответа на анти-PD-1/анти-PD-L1-терапию может предсказывать экспрессия молекул HLA-DR клетками рака [32–34].

Заключение

Частота экспрессии мономорфных детерминант HLA I класса не различалась при молекулярных подтипах РМЖ. Экспрессия молекулы HLA II класса достоверно чаще наблюдалась при люминальном подтипе РМЖ. Экспрессия мономорфных детерминант HLA I класса связана со степенью лимфоидной инфильтрации опухоли. При нелюминальном подтипе плазмочитарная инфильтрация более выражена. Экспрессия Tfr1 достоверно более выражена при люминальном подтипе РМЖ.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
- McCormack V., McKenzie F., Foerster M. et al. Breast cancer survival and survival gap apportionment in sub-Saharan Africa (ABC-DO): a prospective cohort study. *Lancet Glob Health* 2020;8(9):e1203–12. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30261-8
- Пак Д.Д., Рассказова Е.А., Данилова Г.В. Подтипы рака молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2012;(3–4):13–8.
Pak D.D., Rasskazova E.A., Danilova G.V. Subtypes of breast cancer. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy* = Tumors of female reproductive system 2012;(3–4):13–8. (In Russ.).
- Рябчиков Д.А., Безнос О.А., Дудина И.А. и др. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):53–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
Ryabchikov D.A., Beznos O.A., Dudina I.A. et al. Disseminated tumor cells in patients with luminal breast cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):53–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
- Blum J.S., Wearsch P.A., Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 2013;31:443–73. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095910
- Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Иммунология гемопоэза 2009;1(9):8–52.
Artamonova E.V. The role of immunophenotyping in the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Immunologiya gemopoza* = Immunology of hematopoiesis 2009;1(9):8–52. (In Russ.).
- Буров Д.А., Безнос О.А., Воротников И.К. и др. Клиническое значение экспрессии молекул гистосовместимости на клетках рака молочной железы. Иммунология гемопоэза 2016;2(14):33–53.
Burov D.A., Beznos O.A., Vorotnikov I.K. et al. Clinical significance of expression of histocompatibility molecules on breast cancer cells. *Immunologiya gemopoza* = Immunology of hematopoiesis 2016;2(14):33–53 (In Russ.).
- Беришвили А.И., Тупицын Н.Н., Лактионов К.П. Иммунофенотипическая характеристика отечно-инфильтративной формы рака молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2009;(3–4):15–19.
Berishvili A.I., Tupitsyn N.N., Laktionov K.P. Immunophenotypic characteristics of edematous infiltrative form of breast cancer. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy* = Tumors of female reproductive system 2009;(3–4):15–19. (In Russ.).
- Habashy H.O., Powe D.G., Staka C.M. et al. Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119(2):283–93. DOI: 10.1007/s10549-009-0345-x
- Greene C.J., Attwood K., Sharma N.J. et al. Transferrin receptor 1 upregulation in primary tumor and downregulation in benign kidney is associated with progression and mortality in renal cell carcinoma patients. *Oncotarget* 2017;8(63):107052–75. DOI: 10.18632/oncotarget.22323
- Jamnonngkan W., Thanan R., Techasen A. et al. Upregulation of transferrin receptor-1 induces cholangiocarcinoma progression via induction of labile iron pool. *Tumour Biol* 2017;39(7):1010428317717655. DOI: 10.1177/1010428317717655
- Chan K.T., Choi M.Y., Lai K.K. et al. Overexpression of transferrin receptor CD71 and its tumorigenic properties in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2014;31(3):1296–304. DOI: 10.3892/or.2014.2981
- Rosager A.M., Sørensen M.D., Dahlrot R.H. et al. Transferrin receptor-1 and ferritin heavy and light chains in astrocytic brain tumors: expression and prognostic value. *PLoS One* 2017;12(8):e0182954. DOI: 10.1371/journal.pone.0182954
- Leung T.H., Tang H.W., Siu M.K. et al. CD71⁺ population enriched by HPV-E6 protein promotes cancer aggressiveness and radioresistance in cervical cancer cells. *Mol Cancer Res* 2019;17(9):1867–80. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0068
- Kang M.K., Hur B.I., Ko M.H. et al. Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. *BMC Neurosci* 2008;9:15. DOI: 10.1186/1471-2202-9-15
- Ohkuma M., Haraguchi N., Ishii H. et al. Absence of CD71 transferrin receptor characterizes human gastric adenocarcinoma stem cells. *Ann Surg Oncol* 2012;19(4):1357–64. DOI: 10.1245/s10434-011-1739-7
- Sinn B.V., Weber K.E., Schmitt W.D. et al. Human leucocyte antigen class I in hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer: association with response and survival after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2019;21(1):142. DOI: 10.1186/s13058-019-1231-z
- Pedersen M.H., Hood B.L., Beck H.C. et al. Downregulation of antigen presentation-associated pathway proteins is linked to poor outcome in triple-negative breast cancer patient tumors. *Oncoimmunology* 2017;6(5):e1305531. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1305531
- Daniels T.R., Delgado T., Rodriguez J.A. et al. The transferrin receptor part I: biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol* 2006;121(2):144–58. DOI: 10.1016/j.clim.2006.06.010
- Shen Y., Li X., Dong D. et al. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. *Am J Cancer Res* 2018;8(6):916–31.
- Basuli D., Tesfay L., Deng Z. et al. Iron addiction: a novel therapeutic target in ovarian cancer. *Oncogene* 2017;36(29):4089–99. DOI: 10.1038/ncr.2017.11
- Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Поддубная И.В. и др. Анализ взаимосвязи трансферринового рецептора 1 (TfR1) с клинико-морфологическими и иммунофенотипическими характеристиками рака молочной железы. Современная Онкология 2022;24(3):355–60. DOI: 10.26442/18151434.2022.3.201821
Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Poddubnaya I.V. et al. The analysis of the relationship between transferrin receptor 1 (TfR1) and clinical, morphological and immunophenotypic characteristics of breast cancer: retrospective cohort study. *Sovremennaya Onkologiya* = Journal of Modern Oncology 2022;24(3):355–60. (In Russ.). DOI: 10.26442/18151434.2022.3.201821
- Sobral-Leite M., Van de Vijver K., Michaut M. et al. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, *BRCA1*-like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Oncoimmunology* 2018;7(12):e1509820. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1509820
- Denkert C., von Minckwitz G., Darb-Esfahani S. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 2018;19(1):40–50. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30904-X
- De Groot A.F., Blok E.J., Charehbili A. et al. Strong CD8⁺ lymphocyte infiltration in combination with expression of HLA class I is associated with better tumor control in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer*

- Res Treat 2019;175(3):605–15. DOI: 10.1007/s10549-019-05195-y
26. Енгай Д.А., Поддубная И.В., Тупицын Н.Н., Мечетнер Е.Б. Клинико-иммунологическое значение MDR1/PGP 170 при раке молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2008;3:41–3.
Engai D.A., Poddubnaya I.V., Tupitsyn N.N., Mechetner E.B. Clinical and immunological significance of MDR1/PGP 170 in breast cancer. Oukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of female reproductive system 2008;3:41–3. (In Russ.).
 27. Abuzaid H., Abdelrazig S., Ferreira L. et al. Apoferritin-encapsulated Jerantinine A for transferrin receptor targeting and enhanced selectivity in breast cancer therapy. ACS Omega 2022;7(25):21473–82. DOI: 10.1021/acsomega.2c00997
 28. Candelaria P.V., Leoh L.S., Penichet M.L., Daniels-Wells T.R. Antibodies targeting the transferrin receptor 1 (TfR1) as direct anti-cancer agents. Front Immunol 2021;12:607692. DOI: 10.3389/fimmu.2021.607692
 29. Cao J., Hu C., Xu J. et al. Aberrant expression TFR1/CD71 in gastric cancer identifies a novel potential prognostic marker and therapeutic target. Evid Based Complement Alternat Med 2022;2022:4257342. DOI: 10.1155/2022/4257342.
 30. Axelrod M.L., Cook R.S., Johnson D.B., Balko J.M. Biological consequences of MHC-II expression by tumor cells in cancer. Clin Cancer Res 2019;25(8):2392–402. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3200
 31. Webb E.S., Liu P., Baleeiro R. et al. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. J Biomed Res 2018;32(5):317–26. DOI: 10.7555/JBR.31.20160168
 32. Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Поддубная И.В. и др. HLA-мономорфные детерминанты первичной опухоли у больных раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):56–66. DOI:10.17650/1726-9784-2022-21-2-56-66
Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Poddubnaya I.V. et al. HLA-monomorphic determinants of the primary tumor in breast cancer patients. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(2):56–66. (In Russ.). DOI:10.17650/1726-9784-2022-21-2-56-66
 33. Ashizawa T., Iizuka A., Nonomura C. et al. Antitumor effect of programmed death-1 (PD-1) blockade in humanized the NOG-MHC double knockout mouse. Clin Cancer Res 2017;23(1):149–58. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0122
 34. Rodig S.J., Gusenleitner D., Jackson D.G. et al. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. Sci Transl Med 2018;10(450):eaar3342. DOI: 10.1126/scitranslmed.aar3342

Вклад авторов

С.В. Чулкова: анализ данных, написание текста рукописи, перевод на английский язык, оформление статьи;

Е.Н. Шолохова: получение и анализ данных;

И.В. Поддубная, И.С. Стилиди: анализ статьи;

Н.Н. Тупицын: разработка дизайна исследования, анализ данных, анализ статьи.

Authors' contributions

S.V. Chulkova: data analysis, manuscript writing, translation into English, translation of English-language scientific sources, design of the manuscript;

E.N. Sholokhova: data acquisition and analysis;

I.V. Poddubnaya, I.S. Stilidi: analysis of the manuscript;

N.N. Tupitsyn: research design development, data analysis, manuscript analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>

Е.Н. Шолохова / E.N. Sholokhova: <https://orcid.org/0000-0002-1456-1904>

И.В. Поддубная / I.V. Poddubnaya: <https://orcid.org/0000-0002-0995-1801>

И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>

Н.Н. Тупицын / N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без финансовой поддержки.

Funding. The work was done without financial support.

Статья поступила: 10.06.2022. Принята к публикации: 28.10.2022.

Article submitted: 10.06.2022. Accepted for publication: 28.10.2022.