

МКРТЧЯН ВАНУИ АРТАКОВНА

**ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК
ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ
РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Воротников Игорь Константинович
Тупицын Николай Николаевич

Официальные оппоненты:

Высоцкая Ирина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры онкологии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет).

Ковригина Алла Михайловна, доктор биологических наук, заведующая патологоанатомическим отделением федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы».

Защита состоится « 9 » декабря 2021 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01 (Д001.017.01), созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2021 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень ее разработанности

Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующее место в структуре злокачественных опухолей женской репродуктивной системы. Ежегодная смертность от РМЖ, по данным мировой статистики, составляет более 450 000 человек. Гетерогенность РМЖ определяет разнообразность клинического течения заболевания и обуславливает выбор тактики лечения, который подчас представляет собой весьма непростую задачу ввиду многообразия опций в терапии РМЖ [Семиглазов, В.Ф., и др., 2016]. Рациональный выбор тактики лечения больного во многом определяет её эффективность, которая также зависит от состояния иммунной системы пациента. По этой причине на сегодняшний день все больше внимания уделяется изучению противоопухолевого иммунного ответа, реализация которого происходит посредством как адаптивного, так и врожденного иммунитета.

В последние десятилетия фундаментальные исследования в области биологии РМЖ раскрыли ряд важных механизмов взаимодействия опухоли и иммунной системы больного, и появляется все больше доказательств о существенной роли системы врожденного иммунитета в реализации противоопухолевого иммунного ответа. Значительный интерес представляют клетки врожденного иммунитета. Они представлены НК-клетками, цитолитическая активность которых опосредована перфорином, гранзимами, рецепторами TRAIL, FasL [Gruber, I.V., et al.; 2008; Nieto-Velázquez, N.G., et al., 2016], а наличие CD16 обеспечивает реализацию антителозависимой клеточной цитотоксичности [Wu, Y., et al., 2017]; CD5+B1-лимфоцитами, продуцирующими естественные пентамерные антитела класса М, которые посредством связывания с опухоле-ассоциированными гликанами реализуют программу апоптоза опухолевых клеток, получившего название липоаптоз [Татарский, В.В., и др., 2017; Upadhye, A., et al., 2019]; TCR γ/δ -лимфоцитами, которые обладают выраженным цитотоксическим потенциалом, быстро активируются и вовлекаются в процесс онкогенеза, способны обеспечивать элиминацию злокачественных клеток вне контекста молекул главного комплекса гистосовместимости 1-го и 2-го классов [Rampoldi, F., et al., 2020; Silva-Santos, B., et al., 2015; Willcox, C.R., et al. 2012]; миелоидными клетками (гранулоцитами и моноцитами), которые продуцируют различные растворимые факторы, способны к миграции и могут вовлекаться другими эффекторными клетками в противоопухолевый иммунный ответ [Матвеева, В.Г., и др., 2012; Pylaeva, E., et al., 2016; Zilio, S., et al., 2016].

Клетки врожденного иммунитета широко изучаются как в периферической крови (ПК), так и в опухоли, при разных видах злокачественных новообразований, в том числе и при РМЖ.

Это позволяет обнаружить механизмы врожденного иммунного ответа при раке и раскрыть их роль при проведении лечения химиотерапевтическими средствами, иммунопрепаратами, таргетными препаратами [Montero, A.J., et al., 2012, Wen, J., et al., 2015; Muraro, E., et al., 2015; Verma, C. et al., 2015]. Так, установлено, что значительные уровни субпопуляций NK-клеток в ПК у больных РМЖ коррелируют с полным лечебным патоморфозом [Verma, C. et al., 2015]. Также обнаружена положительная взаимосвязь выраженной инфильтрации TCR γ/δ -лимфоцитами с успехом неoadъювантой терапии РМЖ [Newman, A.M. et al., 2015]. Уровень супрессорных клеток миелоидного происхождения (СКМП) в ПК больных РМЖ также связан с непосредственными результатами лекарственного лечения. Так, у пациенток с HER2-негативным РМЖ при проведении неoadъювантной химиотерапии, полный лечебный патоморфоз регистрируется в случаях с меньшим исходным количеством СКМП в ПК [Montero, A.J., et al., 2012]. Интересна потенциальная возможность использования уровня моноцитов ПК в качестве прогностического фактора у больных РМЖ, что продемонстрировано в ряде исследований [Wen, J., et al., 2015; Gu, L., et al., 2016]. Не менее любопытным фактом оказалось влияние бисфосфонатов на активность и экспансию TCR- $\gamma\delta$ лимфоцитов, установленное при РМЖ, что породило идею об использовании TCR- $\gamma\delta$ -клеток как терапевтического агента [Capietto, A.H, et al., 2011; Zysk, A., et al., 2016]. Таким образом, эти и многие другие исследования демонстрируют, что звено врожденного иммунитета при проведении терапии вовлекается в реализацию противоопухолевого эффекта, улучшая процессы активации и миграции в опухолевую ткань клеток-эффекторов, распознавания и элиминации ими злокачественных клеток [Кухарев, Я.В., и др., 2013; Chajon, E, et al., 2017; Zilio, S., et al., 2016].

Изучению клеток врожденного иммунитета в КМ посвящено мало работ. Известно исследование, которое выполнялось при саркомах у детей [Горбунова, Т.В. и др., 2013]. В данной работе показана важная роль субпопуляций Т-клеток, NK-клеток и TCR- $\gamma\delta$ -клеток в процессах гематогенного метастазирования при рабдомиосаркоме (РМС). Установлено диагностическое и прогностическое значение TCR γ/δ -лимфоцитов при распространенных стадиях РМС, которые характеризовались снижением уровня их содержания в КМ. Исследований, посвященных изучению врожденного звена иммунитета в КМ при РМЖ практически нет. Отдельные работы сообщают об изменении клеточного состава, соотношения субпопуляций эффекторных клеток в КМ [Крохина, О.В., 2007, Feuerer, M., et al., 2001].

Следует отметить, что КМ в значительной степени определяет характер взаимодействия опухоли и иммунной системы, поскольку в нем происходит созревание и генерация иммунокомпетентных клеток. При этом он является органом-мишенью для диссеминированных

опухолевых клеток, которые часто обнаруживаются в КМ при РМЖ. Поэтому изучение клеток врожденного иммунитета в КМ больных РМЖ необходимо, так как может помочь глубже понять иммунные механизмы длительного персистирования диссеминированных опухолевых клеток в КМ больных данной категории, а также выявить новые подходы в разработке противоопухолевой терапии.

Цель исследования

Изучение иммунофенотипических характеристик клеток врожденного иммунитета в костном мозге больных раком молочной железы и выявление их взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами.

Задачи исследования

1. Произвести количественную оценку CD5+ В - лимфоцитов в КМ больных РМЖ.
2. Охарактеризовать TCR γ/δ – лимфоциты в КМ больных РМЖ.
3. Представить характеристику NK-клеток (CD16+, CD56+, CD3-) в КМ больных РМЖ.
4. Морфологическими и иммунологическими методами охарактеризовать моноцитарный и гранулоцитарный ростки гемопоэза в КМ больных РМЖ.
5. Провести детальный анализ полученных данных с патоморфологическими характеристиками РМЖ (гистологический вариант, рецепторный статус, Ki67, Her2/neu и т.д.).
6. Изучить взаимосвязь полученных данных с клиническими особенностями РМЖ (размер опухоли, стадия, pN и т.д.).

Методы и методология исследования

В работу включены 64 пациентки с первичным РМЖ и 10 пациенток с доброкачественными изменениями ткани молочной железы (МЖ), которые получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2015г по 2018 гг.

КМ для исследования получен методом стеральной пункции. Изучение КМ проведено на базе лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» с использованием двух методов: морфологического и иммунологического. Морфологическая оценка КМ выполнена с использованием световой микроскопии, которая проводилась двумя независимыми врачами-экспертами после окрашивания препаратов по методу Романовского. Осуществлен подсчет клеточных элементов и расчет индексов миелограммы.

Иммунологически КМ изучен методом многопараметровой проточной цитометрии с применением моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами. Учет реакции выполнен на проточном цитометре FACSCANTOII. Анализ полученных данных проведен с помощью программы FCS3.

Для статистической обработки результатов выполненного исследования разработан специальный кодификатор и использовалось программное обеспечение SPSS, v. 21. Оценку различий между количественными показателями вычисляли по критерию Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и χ^2 .

Научная новизна

Впервые охарактеризованы клетки врожденного иммунитета (CD5+B1, TCR γ/δ , NK) в КМ больных РМЖ. Изучены моноциты, миелоидные предшественники и зрелые гранулоциты в КМ у больных РМЖ. Впервые установлены корреляционные связи между костномозговыми B1-лимфоцитами и TCR γ/δ -лимфоцитами, а также между B1- лимфоцитами и моноцитами при доброкачественных процессах. Впервые выявлено, что уровни B1-лимфоцитов достоверно коррелировали с эозинофильными миелоцитами и плазматическими клетками при РМЖ. Отмечено, что средние уровни B1-лимфоцитов были достоверно более высокими при нормальном или сниженном относительном содержании в КМ сегментоядерных нейтрофилов при РМЖ. Впервые выявлено, что при РМЖ имеется взаимосвязь NK-клеток КМ с эритроидным ростком.

Обнаружена взаимосвязь миелоидных предшественников со стадией и размерами опухоли. Впервые выявлено, что при РМЖ с высоким уровнем пролиферативной активности ($\geq 20\%$) уровни NK-клеток снижены. Впервые показано, при РМЖ, не экспрессирующем Her2/neu, повышены уровни нейтрофильных миелоцитов, индекс созревания клеток гранулоцитарного ростка.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные могут быть использованы для совершенствования методов дифференциальной диагностики доброкачественных процессов и РМЖ. Подобные работы могут иметь не только диагностическое, но и патогенетическое значение при разработке методов коррекции соответствующих дисбалансов.

Угнетение предшественников гранулоцитарного ростка при увеличении размера опухоли и стадии заболевания может служить дополнительным критерием изменений клеточного состава КМ при прогрессировании рака.

Установление ассоциации между снижением базофильных и полихроматофильных эритробластов и нарастанием NK-клеток КМ может дать ключ к пониманию механизмов развития анемий у больных РМЖ и поиску методов их коррекции на основе селективного воздействия на уровни NK-клеток.

Личный вклад

Автором самостоятельно выполнен анализ научной литературы по теме работы, изучена степень разработанности проблемы, на основании чего были сформулированы цель и задачи исследования. Анализ полученных данных предоставил автору возможность самостоятельно разработать «индивидуальную карту больной» (кодификатор).

Автором самостоятельно осуществлялся забор костного мозга посредством стерильной пункции. Также автор принимала непосредственное участие в обследовании и лечении больных, динамическом наблюдении. Сбор, обработка и статистический анализ данных исследования с оценкой полученных результатов, а также подготовка публикаций и оформление диссертационной работы проведены лично Мкртчян В.А.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация Мкртчян Вануи Артаковны соответствует паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия («медицинские науки»).

Положения, выносимые на защиту

1. Существует отрицательная корреляционная связь между популяцией TCR γ/δ -лимфоцитов КМ и индексом созревания эритроидных клеток при доброкачественных процессах, но не при РМЖ.
2. Уровень В1 лимфоцитов коррелирует с уровнем моноцитов при доброкачественных процессах, но не при РМЖ. Имеется выраженная корреляционная связь между костномозговыми В1-лимфоцитами и TCR γ/δ -лимфоцитами при доброкачественных процессах, но не при РМЖ.
3. Уровни костномозговых В1-лимфоцитов достоверно коррелируют с эозинофильными миелоцитами и плазматическими клетками при РМЖ, но не при доброкачественных процессах в ней.
4. Средние уровни В1-лимфоцитов достоверно более высокие при нормальном или сниженном относительном содержании в КМ сегментоядерных нейтрофилов при РМЖ, но не при доброкачественных процессах в ней.
5. Размер опухоли (pT1-pT2-pT3) и стадия РМЖ (Ia-IIa-IIb) взаимосвязаны с уровнями предшественников гранулоцитопоза: при увеличении размера опухоли и возрастании стадии заболевания частота случаев сниженного в сравнении с нормой уровня промиелоцитов и метамиелоцитов увеличивается.

6. Более высокий уровень пролиферативной активности клеток РМЖ ($\geq 20\%$) характеризуется достоверно с более низкими уровнями костномозговых НК-клеток (CD16+CD3- и CD56+CD3-).

7. При полном отсутствии экспрессии рецептора Her2/neu на клетках РМЖ (0, 1+) наблюдаются более высокие уровни нейтрофильных миелоцитов и индекса созревания клеток гранулоцитарного ряда в сравнении со случаями РМЖ, характеризуемыми позитивным Her2/neu рецептором. Уровни В1-лимфоцитов достоверно более высокие при люминальном В Her2-позитивном подтипе, чем при люминальном В-подтипе отрицательном по Her2/neu.

8. НК-клетки КМ взаимосвязаны с эритроидным ростком гемопоэза: при снижении базофильных и полихроматофильных нормобластов уровни НК-клеток (CD16+ CD3- и CD56+CD3-) достоверно более высокие.

Внедрение результатов исследования

Диссертационная работа имеет большое значение для практического здравоохранения, так как в ней освещены механизмы развития анемий у больных раком молочной железы, что поможет поиску методов их коррекции на основе селективного воздействия на НК-клетки, а также предложены методы дифференциальной диагностики доброкачественных процессов и рака молочной железы.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 24 марта 2020 года в 13 часов в конференц-зале НИИ клинической онкологии на совместной научной конференции с участием: онкологического отделения хирургических методов лечения №2, онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтического) №1, онкологического отделения хирургических методов лечения №13, онкологического отделения хирургических методов лечения №5 (онкомамологии), лаборатории иммунологии гемопоэза отдела клинико-лабораторной диагностики НИИ КО; кафедры онкологии института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), кафедры онкологии и лучевой терапии Московского Государственного медико-стоматологического университета им.А.И. Евдокимова.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 научные работы, в том числе, 2 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, литературного обзора, четырех глав, посвященных результатам и их обсуждению, экспериментальной части, выводов, словарю терминов и списка литературы, который содержит 240 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В настоящем исследовании представлены 64 пациентки с диагнозом РМЖ и 10 пациенток с доброкачественными изменениями ткани МЖ (фиброаденома, фиброзно-кистозная мастопатия, аденоз молочной железы, внутрипротоковая папиллома), которые получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2015г по 2018г. Основным критерием включения в исследование являлось изучение образцов костномозгового пунктата у первично-операбельных больных РМЖ. Пациентки, получавшие неоадьювантное лечение, из исследования были исключены. У каждой пациентки в обеих исследуемых группах было взято письменное согласие (отображено в стационарной карте) на проведение стерильной пункции, с подробным разъяснением цели процедуры. Полученные результаты морфологического исследования костного мозга (миелограммы) с подробной интерпретацией данных переданы пациенткам. При обработке материала учитывались такие клинические данные как возраст, стадия заболевания, локализация опухолевого узла, размер и их количество. Возраст больных РМЖ варьировал от 28 до 77 лет (в среднем 56 лет). В исследовании преобладали больные со ПА стадией (n=27, 36,5%), что представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение больных РМЖ по стадиям заболевания

Стадия РМЖ	n(%)
Рак IS- 0 стадия	3 (4,1%)
I стадия - T1N0M0	15 (20,3%)
Па стадия –T1N1M0	10 (13,5%)
Па стадия – T2N0M0	17 (23,0%)
Пв стадия – T2N1M0	18 (24,3%)
TxN1M0	1 (1,4%)
Итого	64 (100%)

Распределение больных РМЖ в зависимости от гистологического типа опухоли было следующим (Рисунок 1). В большинстве случаев (n=48, 72%) определен инвазивный протоковый рак. У трех (6%) больных выявлен протоковый рак in situ. В 5 (8%) случаях установлен инвазивный дольковый рак. У 7 (11%) пациенток наблюдались редкие

гистологические виды РМЖ: тубулярный, медуллярный и папиллярный, метапластический. В одном случае (2%) РМЖ был смешанного строения.

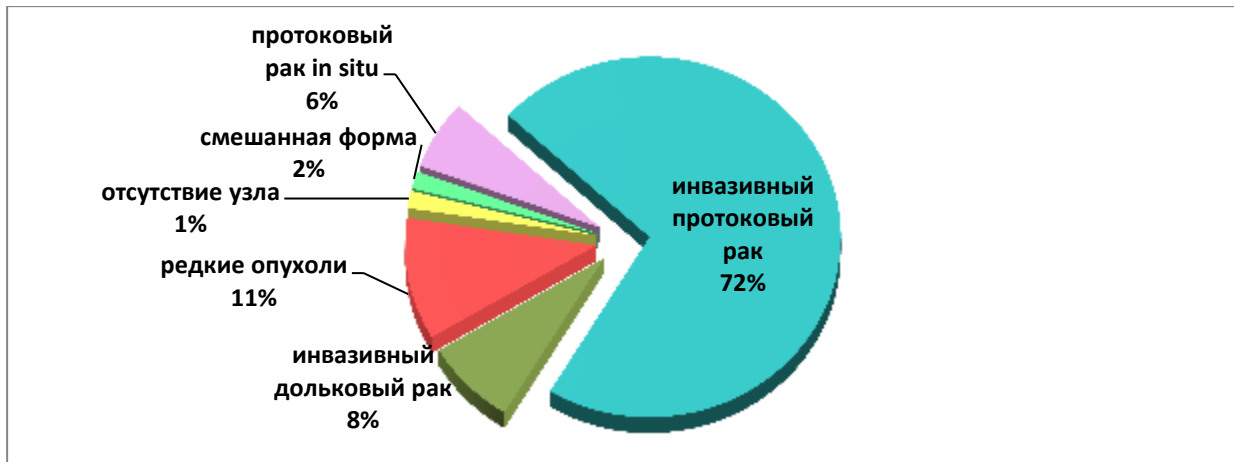


Рисунок 1 - Гистологические типы РМЖ

При анализе молекулярного подтипа установлено, что у 15 (23%) больных был определен люминальный А тип; у 23 (38%) пациенток - люминальный В Her2- негативный тип; у 14 (22%) пациенток - люминальный В Her2- позитивный; Her2- позитивный тип определен лишь у 3 (5%) пациенток; базальноподобный тип - у 6 (9%) пациенток. У 3 (3%) пациенток принадлежность опухоли к люминальным типам не (выявлен внутрипротоковый рак in situ) (Рисунок 2).



Рисунок 2 - Распределение больных в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ

Всем пациенткам, вошедшим в исследование, на первом этапе было выполнено хирургическое лечение в объеме: секторальной резекции – 1(2%) пациентке, органосохраняющей операции – радикальной резекции молочной железы – 19 (30%) пациенткам, мастэктомии с сохранением грудных мышц – 39 (62%) пациенткам, мастэктомии с

одномоментной реконструкцией молочной железы – 4 (6%) пациенткам. Часть больных получила адъювантную химиотерапию (Доцетаксел + Циклофосфан, Циклофосфан + Доксорубицин, Доксорубицин + Доцетаксел, Доцетаксел + Карбоплатин, Доцетаксел, Капецитабин) (Таблица 2).

Таблица 2 - Варианты адъювантной химиотерапии больных РМЖ

Адъювантная ПХТ	n (%)
АС	15 (23,4 %)
АС + Т	5 (7,8%)
Т	6 (9,4%)
не назначалась	17 (26,5%)
АС + Золадекс	1 (1,6%)
АС + Т	8 (12,5%)
АС + Золадекс	1 (1,6%)
АТ	8 (12,5%)
Капецитабин	1 (1,6%)
Доцетаксел + Карбоплатин	1 (1,6%)
ТС	1 (1,6 %)
Итого	64 (100%)

Всем больным выполнен забор КМ путем стерильной пункции. Объем пунктата не превышал 0,25- 0,5 мл во избежание контаминации образца периферической кровью.

Морфологическое исследование КМ

Первым этапом выполнялась оценка количества миелокариоцитов КМ. Затем проводился подсчет клеточных элементов и расчет индексов миелограммы (индекса созревания эритрокариоцитов, индекса созревания нейтрофилов, соотношение лейкоцитов и эритроцитов). У всех больных было исключено метастатическое поражение КМ в пределах исследованного материала (6 препаратов). В исследование были включены только те образцы, в которых морфологически была исключена примесь периферической крови.

Имунофенотипирование КМ

После выделения клеток КМ их инкубировали с моноклональными антителами, напрямую меченными различными флюорохромами (Таблица 3). На проточном цитометре FACSCANTO II для каждой пробы собирали не менее 100.000 событий. Исследования субпопуляций лимфоцитов КМ проводили в гейте CD45++клеток с низкими характеристиками бокового светорассеяния лазерного луча (SSC_{low}). Пробы 1 и 2 предназначены для изучения В-клеточного иммунитета (В1-клеток). Проба 3 – характеристика TCRγδ-лимфоцитов. Пробы 4-6

– характеристика NK- и NKT-лимфоцитов. Анализ данных проводили с помощью программы FCS3.

Таблица 3 - Панель антител для изучения субпопуляций лимфоцитов КМ больных РМЖ

№ пробы	Флуорохромы и специфичность антител							
	FITC	PE	PerCP-	PerCP-	APC	APC-	V450	V500
1	CD20	CD95	CD27	CD5	CD3	CD19	CD4	CD45
2	CD22	CD38	CD27	CD5	CD3	CD19	–	CD45
3	CD4	CD25	CD3	TCR $\gamma\delta$	CD5	CD8	CD2	CD45
4	CD16	CD45RO	CD3	CD56	CD94	CD8	CD2	CD45
5	CD16	HLA-DR	CD3	CD56	CD94	CD8	CD2	CD45
6	CD16	CD7	CD3	CD56	CD94	CD8	CD2	CD45
7	Perforin	Granzyme	CD3	CD56	CD94	–	–	CD45
8	CD57	CD26	CD3	CD56	CD94	–	–	CD45

Результаты исследования

НК-клетки костного мозга больных РМЖ

Сравнение уровня субпопуляций лимфоцитов КМ при РМЖ и доброкачественных процессах в ней не выявило существенных различий. Лишь уровни Т-клеток, экспрессирующих CD16, были несколько более высокими у больных РМЖ в сравнении с доброкачественными процессами в МЖ: $3,4\pm 0,89\%$ (n=49) и $1,45\pm 0,4\%$ (n=9), $p=0,055$.

Не установлено различий в уровнях НК-клеток КМ в зависимости от размера опухоли, наличия метастазов в лимфатические узлы, в частности, в наиболее многочисленных группах N0 и N1.

Не выявлено достоверных различий в уровне костномозговых субпопуляций НК-клеток у больных РМЖ в зависимости от стадии заболевания, рецепторного статуса опухолевых клеток (рецепторы эстрогенов, прогестерона), а также наличия или отсутствия рецептора Her2/neu.

Следующим этапом выполнена оценка субпопуляционного состава лимфоцитов КМ у больных РМЖ в зависимости от индекса пролиферативной активности (Таблица 4).

Уровни Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD16-рецептор, были достоверно более высокими у больных с низкой пролиферативной активностью клеток РМЖ. Аналогично, содержание субпопуляции НК-клеток (CD16+CD3-, CD56+CD3-) было более выраженным при РМЖ с низким индексом пролиферативной активности (менее 20% Ki-67+ опухолевых клеток). Особенно существенные различия отмечены в отношении популяции CD56+CD3- лимфоцитов: 9,4% и 14,6%, $p=0,009$. Пример выраженной пропорции НК-клеток (CD56+CD3-) представлен на рисунке 3А.

Таблица 4 - Взаимосвязь субпопуляций Т, Т/НК лимфоцитов КМ с уровнем пролиферативной активности (Ki-67)

Субпопуляция лимфоцитов	Ki67, %	N	M±m	P
CD56+CD16+ (%% среди НК-клеток)	≥ 20,00	6	77,4±4,2	0,021
	< 20,00	4	91,8±2,6	
CD16+CD3-	≥ 20,00	29	11,1±1,2	0,028
	< 20,00	17	15,8±1,8	
CD16+CD3+	≥ 20,00	18	2,4±0,4	0,045
	< 20,00	6	6,5±3,3	
CD56+CD3-	≥ 20,00	30	9,4±1,1	0,009
	< 20,00	18	14,6±1,6	
CD3+	≥ 20,00	32	63,0±2,0	NS*
	< 20,00	19	62,0±1,6	

*NS - различия статистически не значимы

Интересно отметить, что популяция НК-клеток КМ, экспрессирующих оба маркера (CD16+CD56+CD3-), во всех случаях РМЖ была доминирующей среди НК-клеток, но достоверно преобладала при раке с низкой пролиферативной активностью (92% и 77%, $p=0,021$). Это новая характеристика, которая ранее не была описана. Пример популяции НК-клеток, ко-экспрессирующих CD16 и CD 56 представлен на Рисунке 3В.

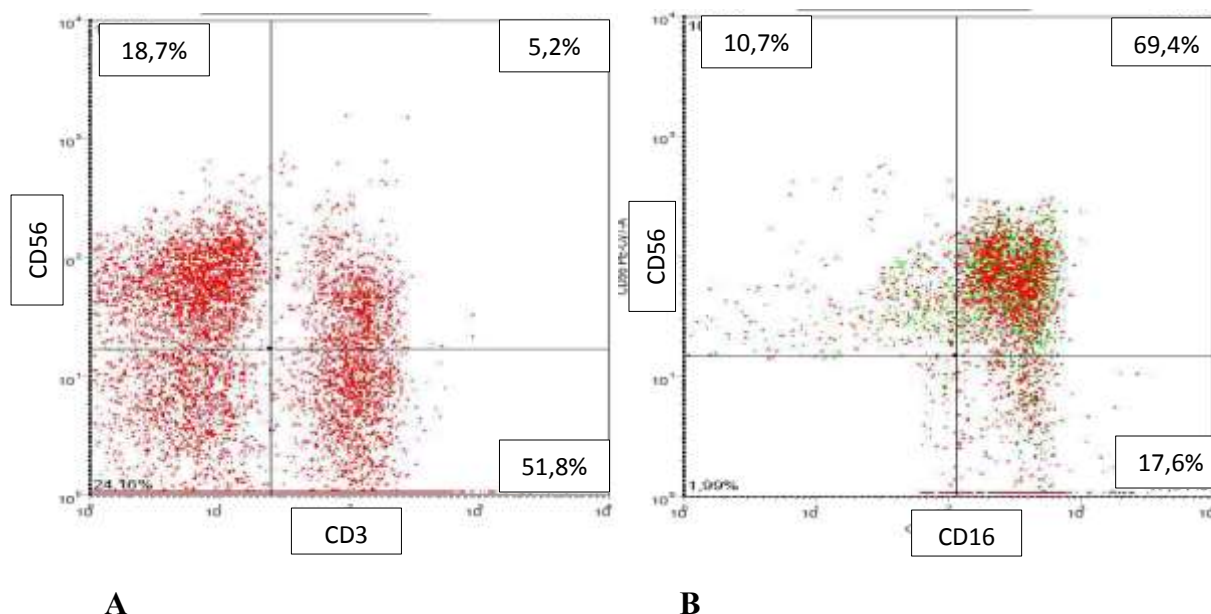


Рисунок 3 - Выраженная пропорция НК-клеток у больной РМЖ.

А. Популяция CD56+CD3-клеток составляет 18,75%.

В. НК-клетки, ко-экспрессирующие CD56 и CD16, составляют 69,4%.

Следующим этапом мы оценили, насколько изменения эритропоэза взаимосвязаны с уровнями НК-клеток в КМ больных РМЖ. Интересно отметить, что более высокие значения НК-клеток по обоим показателям были отмечены у больных со снижением базофильных нормобластов. Для популяции CD16+CD3- показатели в случаях снижения базофильных нормобластов составили $13,6 \pm 1,2\%$ (n=36), в случаях с нормальным содержанием этих клеток - $7,9 \pm 1,6\%$ (n=8), $p=0,013$. Для популяции CD56+CD3-: $12,2 \pm 1,2\%$ (n=38) и $7,5 \pm 1,2\%$ (n=8), $p=0,012$.

Аналогичным образом, уровни полихроматофильных нормобластов были взаимосвязаны с этими двумя популяциями НК-клеток. Более высокие уровни CD16+CD3- клеток отмечены при снижении полихроматофильных нормобластов в сравнении с показателями при нормальных уровнях этих клеток: $15,4 \pm 1,3\%$ (n=26) и $9,1 \pm 1,6\%$ (n=16), $p=0,004$. Аналогичные цифры для популяции CD56+CD3- клеток: $13,7 \pm 1,3\%$ (n=27) и $8,5 \pm 1,4\%$ (n=17), $p=0,013$.

Для оксифильных нормобластов достоверных различий по НК-клеткам не получено. Популяция с ко-экспрессией CD16 и CD56 на НК-клетках преобладала у больных РМЖ с нормальными уровнями оксифильных нормобластов в сравнении с группой больных с повышенными уровнями этих клеток, однако, количество наблюдений невелико: $89,7 \pm 2,9\%$ (n=4) и $75,4 \pm 4,3\%$ (n=5), $p=0,036$.

Таким образом, наши данные указывают на то, что НК-клетки обеих субпопуляций (CD56+ CD3- и CD16+ CD3-), а также T/NK лимфоциты с фенотипом CD16+CD3+ преобладают у больных РМЖ с низкой пролиферативной активностью. Следует обратить внимание, что по мере нарастания уровней пролиферативной активности содержание этих субпопуляций в КМ больных РМЖ снижается.

Костномозговые популяции клеток врожденного иммунитета

(TCR $\gamma\delta$ -клетки, В1-лимфоциты) больных РМЖ

Оценка средних значений содержания TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов и В1-лимфоцитов в КМ больных РМЖ в зависимости от стадии опухолевого процесса выявила некоторое преобладание TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов при IIb стадии (T2N1M0) (Таблица 4). Однако в целом взаимосвязи уровней костномозговых TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов со стадией РМЖ не отмечено. В отношении В1-лимфоцитов преобладание наблюдалось при IIa стадии.

Не установлено взаимосвязи TCR $\gamma\delta$ - и В1-лимфоцитов с размером опухоли, с фактом поражения лимфатических узлов, а также с локализацией метастазов (подмышечные, подключичные, парастернальные лимфоузлы). Не отмечено связи с количеством метастатически измененных лимфатических узлов и их максимальным размером.

Таблица 4 - Уровни костномозговых TCR $\gamma\delta$ -клеток и В-лимфоцитов (M \pm m) при различных стадиях РМЖ

Стадия РМЖ	В1- лимфоциты		TCR $\gamma\delta$ - лимфоциты	
	(M \pm m)	N	(M \pm m)	N
0 - TisN0M0	1,8 \pm 0,4	2	2,7 \pm 1,7	2
IA - T1N0M0	5,7 \pm 1,8	17	4,3 \pm 0,8	18
IIa - T1N1M0	12,4\pm10,7	5	4,1 \pm 1,1	4
IIa - T2N0M0	6,8\pm3,7	9	3,9 \pm 0,7	9
IIb - T2N1M0	4,9 \pm 2,5	6	5,3 \pm 1,6	4
IIb - T3N0M0	6,2 \pm 0,2	2	2,6 \pm 0,4	2

Однако, следует отметить, что максимальные уровни клеток врожденного иммунитета в КМ отмечены при наличии двух пораженных лимфатических узлов. Так, для TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов соответствующие значения составили: 6,0 \pm 0,84% (n=4) и 3,8 \pm 0,5% (n=31), p=0,075. Для В1 лимфоцитов: 16,0 \pm 10,2% (n=5) и 5,8 \pm 1,6% (n=29), p=0,07. Хотя количество больных с поражением двух лимфатических узлов невелико, совпадение данных по двум субпопуляциям клеток врожденного иммунитета и близкие к достоверным уровни значимости различий между этой группой больных и пациентками, не имеющими метастазов в лимфатических узлах, позволяет задуматься о возможном напряжении врожденного иммунитета на этапе явного лимфогенного распространения опухоли за пределы первичного очага.

Связь уровней TCR $\gamma\delta$ -клеток и В1-лимфоцитов с гистологическим типом опухоли, с рецепторным статусом опухоли, уровнем экспрессией Her2/neu и индексом пролиферации опухоли отсутствовала.

Следующим этапом работы было изучение уровней субпопуляций TCR $\gamma\delta$ - и В1-лимфоцитов при разных молекулярных подтипах РМЖ. Установлены достоверные различия в уровнях В1- лимфоцитов при люминальном В Her2-негативном и люминальном В Her2-позитивном подтипах. Максимальное количество В1-клеток отмечены при Her2-позитивном РМЖ 10,2% (n=10) против 4,0% (n=20), p=0,032 (Таблица 5).

При сравнении двух групп (люминального В Her2-позитивного подтипа и Her2-негативного подтипа) выявлена та же тенденция в отношении популяции В1-лимфоцитов; различия близки к достоверным (p=0,066) однако, группа была слишком малочисленна (n=2).

В отношении популяции TCR $\gamma\delta$ -клеток различий в анализируемых группах РМЖ не получено.

Таблица 5 - Уровни TCR $\gamma\delta$ - и B1-лимфоцитов при люминальных В подтипах РМЖ

	Молекулярный подтип	n	Среднее	P
CD5+В-клетки	люминальный В (Her2-)	20	4,0	0,032
	люминальный В (Her2+)	10	10,2	
TCR $\gamma\delta$ -клетки	люминальный В (Her2-)	17	4,01	0,57
	люминальный В (Her2+)	12	4,6	

Далее была выполнена оценка корреляционных связей TCR $\gamma\delta$ -клеток с остальными субпопуляциями лимфоцитов КМ, которая проведена в пределах всей выборки больных. Достоверные связи установлены только с CD5+ В-клетками: R=0,28; p=0,044; n=52. При отдельном анализе, выявлено, что при РМЖ корреляция между CD5+ В-лимфоцитами и TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитами отсутствовала (p>0,05). Напротив, при доброкачественных процессах корреляционные связи между этими двумя субпопуляциями были очень высокими: R=0,757; p=0,03; n=8. Таким образом, при РМЖ между клетками врожденного иммунитета TCR $\gamma\delta$ - и B1-лимфоцитами в КМ утрачивается указанная корреляция.

Необходимо отметить, что, несмотря на высокие коэффициенты корреляции и достоверность взаимосвязи, количество больных в группе сравнения с доброкачественными процессами невелико (n=10), и поэтому необходимо дальнейшее накопление материала.

Следующим этапом работы было сопоставление уровней клеток врожденного иммунитета при РМЖ и доброкачественных заболеваниях с показателями миелограммы (Таблица 6).

Таблица 6 - Корреляционные связи TCR $\gamma\delta$ - и B1-лимфоцитов с показателями миелограммы при РМЖ и доброкачественных заболеваниях

Пара маркеров	РМЖ	Доброкачественные заболевания
TCR $\gamma\delta$ - индекс созревания эритроидных клеток	-	R= - 0,688; p=0,04; n=9
B1-лимфоциты – эозинофильные миелоциты	R= 0,331; p=0,012; n=57	-
B1-лимфоциты- плазматические клетки	R=0,399; p=0,002; n=57	-
B1- лимфоциты – моноциты	-	R=-0,953; p=0,002; n=9.

Корреляционные связи TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов с клеточными типами и индексами, выделяемыми в миелограмме, в целом по группе изученных пациенток отсутствовали.

Аналогичным образом, отсутствовали соответствующие связи у больных РМЖ. Интересно отметить, что при доброкачественных заболеваниях МЖ установлена обратная достоверная корреляционная связь TCR γ δ -лимфоцитов с индексом созревания эритроидных клеток: $R=-0,688$; $p=0,04$; $n=9$. В целом, по обследованной группе наблюдалась достоверная корреляционная связь B1(CD5+)-лимфоцитов с эозинофильными миелоцитами ($R=0,331$; $p=0,012$; $n=57$), а также с плазматическими клетками ($R=0,399$; $p=0,002$; $n=57$).

У пациенток со сниженным или нормальным содержанием сегментоядерных нейтрофилов отмечены достоверно более высокие уровни этих клеток (CD5+B1-лимфоцитов) в сравнении со случаями повышения сегментоядерных нейтрофилов: $8,1\pm 1,8\%$ ($n=39$) и $2,0\pm 0,5\%$ ($n=19$); $p=0,002$. У больных РМЖ отмечены те же взаимосвязи: для эозинофильных миелоцитов $R=0,365$; $p=0,011$; $n=48$; для плазматических клеток $R=0,409$; $p=0,004$; $n=48$. Средние уровни CD5+B1-лимфоцитов также были достоверно более высокими при нормальных или сниженных значениях сегментоядерных нейтрофилов в сравнении со случаями повышения этих клеток: $8,5\pm 2,0\%$ ($n=33$) и $1,7\pm 0,47\%$ ($n=16$), $p=0,003$.

При доброкачественных процессах установлена высоко достоверная обратная корреляционная связь популяции CD5+B1-лимфоцитов с количеством моноцитов: $R=-0,953$; $p=0,002$; $n=9$.

Таким образом, сопоставление уровней клеток врожденного иммунитета при РМЖ и доброкачественных заболеваниях с показателями миелограммы, выявило достоверные взаимосвязи B1(CD5+)-лимфоцитов с клетками миелоидного ряда.

Уровни клеток гранулоцитарного роста в КМ больных РМЖ: клинико-морфологические и иммунологические параллели

Характеристика взаимосвязей различных клеточных типов с нормальными значениями представлена в таблице 7. Обращали внимание 2 основных момента – снижение предшественников гранулоцитарного ряда (промиелоцитов – в 88,3%, метамиелоцитов – в 32,8%), а также индекса созревания нейтрофилов – в 52,5%. Повышение уровней отмечалось для зрелых гранулоцитов – 29,5%, а также всех клеток гранулоцитарного роста – в 42,6%.

Таблица 7 - Взаимоотношения различных типов клеток гранулоцитарного роста, выделяемых в миелограмме больных РМЖ, с уровнями этих клеток в норме

Клеточный тип	Показатель	Количество	Процент
Промиелоциты	Повышены	0	0
	Снижены	53	88,3
	Норма	7	11,7

Продолжение таблицы 7

Нейтрофильные Миелоциты	Повышены	13	21,3
	Снижены	5	8,2
	Норма	43	70,5
Нейтрофильные метамиелоциты	Повышены	0	0
	Снижены	20	32,8
	Норма	41	67,2
Палочкоядерные нейтрофилы	Повышены	15	24,6
	Снижены	1	1,6
	Норма	45	73,8
Сегментоядерные нейтрофилы	Повышены	18	29,5
	Снижены	3	4,9
	Норма	40	65,6
Эозинофильные миелоциты	Повышены	2	3,3
	Снижены	1	1,6
	Норма	57	95,0
Эозинофильные палочкоядерные	Повышены	12	19,7
	Снижены	1	1,6
	Норма	47	77
Эозинофильные сегментоядерные	Повышены	3	4,9
	Снижены	0	0
	Норма	58	95,1
Базофильные Сегментоядерные	Повышены	5	8,6
	Снижены	3	5,2
	Норма	50	86,2
Все клетки гранулоцитарного ростка	Повышены	26	42,6
	Снижены	4	6,6
	Норма	31	50,8
Индекс созревания нейтрофилов	Повышены	1	1,6
	Снижены	32	52,5
	Норма	28	45,9

Сопоставление уровней клеток гранулоцитарного ростка с клиническими характеристиками опухоли

Установлено, что наибольшая частота случаев с нормальным содержанием промиелоцитов (20,8%) наблюдалась при малом размере опухолей (pT1), в то время как при опухолях большего размера составила лишь 3,6% при pT2 и 0%(при pT3 (p=0,045) (Таблица 8).

Таблица 8 - Взаимосвязь между размером опухоли (pT) и уровнем промиелоцитов КМ

Размер опухоли (pT)	Промиелоциты		Итого
	снижены	Норма	
T1	19 (79,2%)	5(20,8%)	24(100%)
T2	27 (96,4%)	1(3,6%)	28(100%)
T3	4 (100%)	0 (0%)	4(100%)
Итого	50 (89,3%)	6 (10,7%)	56(100%)

При анализе уровней нейтрофильных метамиелоцитов, индекса созревания нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов, суммарного числа клеток гранулоцитарного ростка достоверной связи с размером опухоли (pT) не установлено.

Оценка взаимосвязи клеток гранулоцитарного ростка КМ больных РМЖ с наличием метастатического поражения лимфатических узлов достоверных различий не выявила. При этом следует отметить, что по мере нарастания поражения лимфатических узлов от pN0 до pN2 частота снижения индекса созревания нейтрофилов возрастала 48,6%-57,1%-80%. Также интересно, что при наличии метастазов в лимфоузлах случаи нормального содержания сегментоядерных нейтрофилов отсутствовали: содержание этих клеток в образцах КМ было либо снижено, либо повышено.

Следующим разделом нашей работы стал анализ взаимосвязи клеток гранулоцитарного ростка КМ со стадией заболевания. Следует отметить, что наблюдается четкая тенденция по нарастанию процента сниженной пропорции промиелоцитов в КМ от стадии Ia к стадии Ib от 79% до 100% ($p=0,046$). Сходная тенденция отмечена в отношении нейтрофильных метамиелоцитов ($p=0,06$). В отношении других показателей гранулоцитарного ростка достоверных различий не установлено.

Взаимосвязь показателей гранулоцитопоза с патоморфологическими характеристиками РМЖ и рецепторным статусом

Сравнение средних уровней молодых форм гранулоцитов, зрелых гранулоцитов, а также индекса созревания нейтрофилов при различных морфологических вариантах РМЖ не выявило различий. Также не наблюдалось взаимосвязи между показателями гранулоцитопоза и степенью злокачественности, индексом пролиферативной активности клеток РМЖ.

Представляло интерес оценить наличие связи между рецепторным статусом РМЖ и содержанием молодых, а также зрелых форм гранулоцитов анализируемых образцов КМ. Ни по одному из перечисленных показателей не установлено достоверных связей.

Далее был выполнен анализ взаимосвязи уровня экспрессии рецептора Her2/neu на клетках РМЖ с показателями гранулоцитарного ростка. Результаты выполненного анализа приведены в таблице 9. Достоверно более низкие уровни нейтрофильных метамиелоцитов в анализируемых образцах КМ наблюдаются при выраженной экспрессии рецептора Her2/neu (≥ 2) опухолевыми клетками по сравнению с образцами с низким уровнем экспрессии (< 2): $8,3 \pm 0,4$ ($n=42$) и $9,6 \pm 0,5$ ($n=19$), соответственно ($p=0,043$). Те же закономерности выявляются и для индекса созревания нейтрофилов: $0,4 \pm 0,02$ ($n=42$) и $0,5 \pm 0,03$ ($n=19$), соответственно ($p=0,005$). Средние значения уровней сегментоядерных нейтрофилов в случаях Her2/neu

позитивного РМЖ были повышены, однако статистически значимых различий не достигнуто ($22,5 \pm 1,0$ и $19,5 \pm 1,1$) $p=0,052$.

Таблица 9 - Уровень экспрессии рецептора Her2/neu на клетках РМЖ в зависимости от содержания различных типов клеток гранулоцитарного ряда в КМ

Клеточный тип	Her2/neu	N	M±m	P
Промиелоциты	≥ 2	42	$0,4 \pm 0,06$	0,46
	< 2	19	$0,3 \pm 0,1$	
Нейтрофильные метамиелоциты	≥ 2	42	$8,3 \pm 0,4$	0,043
	< 2	19	$9,6 \pm 0,5$	
Индекс созревания нейтрофилов	≥ 2	42	$0,4 \pm 0,02$	0,005
	< 2	19	$0,5 \pm 0,03$	
Сегментоядерные нейтрофилы	≥ 2	42	$22,5 \pm 1,0$	0,052
	< 2	19	$19,5 \pm 1,1$	
Все клетки гранулоцитарного роста	≥ 2	42	$66,5 \pm 1,2$	0,13
	< 2	19	$64,0 \pm 1,1$	

Таким образом, при характеристике гранулоцитопоза у больных РМЖ было впервые установлено, что наименее зрелые клетки гранулоцитарного роста – промиелоциты и метамиелоциты – снижены у значительной части больных: промиелоциты – у 88,3% больных, метамиелоциты – у 32,8% больных, снижен также индекс созревания нейтрофилов у 52,5% больных. Вместе с тем, отмечалось повышение уровня зрелых гранулоцитов у 29,5% больных, а также суммарного содержания клеток гранулоцитарного роста у 42,6% больных. Установлена взаимосвязь уровней промиелоцитов с размерами опухоли, стадией заболевания. Her2/neu+ РМЖ ассоциирован с более низкими уровнями нейтрофильных миелоцитов и индексом созревания клеток гранулоцитарного ряда.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена отрицательная корреляционная связь между популяцией TCR γ/δ -лимфоцитов КМ и индексом созревания эритроидных клеток; существует выраженная корреляционная связь между В1-лимфоцитами и моноцитами; определена значимая корреляционная связь между костномозговыми В1-лимфоцитами и TCR γ/δ -лимфоцитами при доброкачественных процессах в МЖ.

2. Уровни костномозговых В1-лимфоцитов достоверно коррелировали с эозинофильными миелоцитами и плазматическими клетками; средние уровни В1-лимфоцитов были достоверно более высокими при нормальном или сниженном относительном содержании в КМ сегментоядерных нейтрофилов при РМЖ.

3. Размер опухоли (pT1-pT2-pT3) и стадия РМЖ (Ia-IIa-IIb) были взаимосвязаны с уровнями предшественников гранулоцитопоза: при увеличении размера опухоли и возрастании стадии заболевания частота случаев сниженного в сравнении с нормой уровня промиелоцитов и метамиелоцитов увеличивались.

4. Более высокий уровень пролиферативной активности клеток РМЖ ($\geq 20\%$) характеризовался достоверно более низкими уровнями костномозговых НК-клеток (CD16+CD3- и CD56+CD3-).

5. При выраженной экспрессии рецептора Her2/neu получены достоверно более низкие уровни нейтрофильных метамиелоцитов ($p=0,043$) и индекса созревания клеток гранулоцитарного ряда ($p=0,005$) в сравнении с Her2/neu негативным вариантом опухоли. Уровни В1-лимфоцитов были достоверно более высокими при люминальном В Her2-позитивном подтипе, по сравнению с люминальным В Her2/neu отрицательным подтипом ($p=0,032$).

6. НК-клетки КМ коррелируют с эритроидным ростком гемопоэза: при снижении базофильных и полихроматофильных нормобластов уровни НК-клеток (CD16+CD3- и CD56+CD3-) достоверно более высокие ($p=0,013$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Морфологическое исследование КМ целесообразно дополнять проведением иммунофенотипирования КМ методом проточной цитометрии, особенно при наличии отклонений от нормы со стороны показателей гранулоцитарного и эритроидного ростка КМ.

2. Определение уровня костномозговых НК-клеток позволяет определять группы больных РМЖ с более высокой пролиферативной активностью, что необходимо для последующего дифференцированного выбора лекарственной терапии.

3. Определение уровня костномозговых В1-лимфоцитов может служить в качестве дополнительного маркера молекулярного подтипа РМЖ.

4. Угнетение предшественников гранулоцитарного ростка КМ больных РМЖ можно рассматривать как основание для селективного назначения поддерживающей терапии на этапах лекарственного лечения больных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мкртчян, В.А.** Взаимосвязь между НК-клетками костного мозга больных раком молочной железы и биологическими особенностями опухоли / В.А. Мкртчян, И.К. Воротников, О.А. Чернышева, А.Д. Палладина, Н.Н. Тупицын. // Онкогинекология. – 2019. – №3. – С.4- 13.
2. Tupitsyn, N.N. Bone Marrow Lymphocyte Populations of Innate Immunity in Breast Cancer Patien / N.N. Tupitsyn, **V.A. Mkrтчyan**, A.D. Palladina, I.K. Vorotnikov // Global Journal of Medical Research. – 2020. – Т. 20., № 2. – С. 20-27.
3. **Мкртчян В.А.** Взаимосвязь костномозговых популяций врожденного иммунитета (TCR $\gamma\delta$ -клетки, B1 (CD5+)-лимфоциты) у больных раком молочной железы с клиническими показателями и гемопоэзом / Н.Н. Тупицын, В.А. Мкртчян, А.Д. Палладина, И.К. Воротников // Онкогинекология. – 2020. – №1. – С.23- 30.