

ЧУЛКОВА СВЕТЛАНА ВАСИЛЬЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТОРНЫХ ЗВЕНЬЕВ ИММУНОПОЭЗА
ПРИ ОПУХОЛЯХ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

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

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Тупицын Николай Николаевич

Официальные оппоненты:

Зикирходжаев Азизжон Дилшодович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением онкологии и реконструктивно-пластической хирургии молочной железы и кожи Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кедрова Анна Генриховна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая онкологическим отделением федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства».

Боженко Владимир Константинович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр российской академии наук».

Защита состоится «15» февраля 2024 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2023 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Актуальной проблемой онкологии остаются злокачественные опухоли женской репродуктивной системы. Они во многих странах Европы и в США занимают одно из ведущих мест в структуре общей онкологической заболеваемости и смертности женского населения [American Cancer Society, 2023]. У женщин России удельный вес опухолей женской репродуктивной системы составляет 39,1%, включая опухоли молочной железы, при этом 18,2% приходится на долю опухолей половых органов (шейки матки, тела матки, яичников) [Каприн А.Д., 2022].

Несмотря на внедрение новейших технологий и достигнутые успехи в области диагностики опухолей значительное количество случаев заболевания выявляется на распространенных стадиях опухолевого процесса, и прежде всего это касается рака шейки матки, рака яичников, рака тела матки. Возможности даже современных методов лечения на поздних стадиях ограничены, что находит отражение в стабильно высоких показателях смертности, которые возросли с 2008 по 2021 гг [Каприн А.Д., 2022]. Смертность в 2021 году на 100 000 населения от рака шейки матки составила 4,5%, от рака тела матки – 5,2%, от рака яичников – 5,6%, от рака молочной железы – 15,0%. Следует отметить, что существенная доля среди причин смерти женщин от злокачественных опухолей в репродуктивном возрасте (моложе 30 лет) принадлежит раку шейки матки и яичников (7,0% и 3,6% соответственно) [Каприн А.Д., 2019].

Следовательно, результаты лечения опухолей женской репродуктивной системы даже с привлечением современных методов остаются малоудовлетворительными, и существует острая необходимость поиска альтернативных путей, которые могут исправить ситуацию и позволят добиться повышения эффективности лечения. Одним из таких путей на сегодняшний день является индивидуализированная терапия, которая преследует своей целью подбор лекарственного воздействия с учетом молекулярно-биологических особенностей опухоли, а также иммунологической реактивности организма. В настоящее время установлено, что при опухолевом росте нарушаются практически все механизмы иммунного ответа, как врожденного, так и приобретенного [Хаитов Р.М., 2018]. Эти нарушения проявляются в отношении антигенпредставляющих клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, естественных клеток-киллеров, активированных лимфокинами киллерных клеток, моноцитов, нейтрофилов, незрелых миелоидных клеток, что в совокупности, нарушая строго контролируемый процесс иммуногенеза, дает преимущество в выживании трансформированным клеткам [Дейчман Г.И., 2000, Манько В.М., 2016, Шубина И.Ж., 2015,

D'Alessandris N., 2021]. Поэтому принципиально важными оказываются исследования, направленные на изучение иммунологического гомеостаза при различных видах злокачественных новообразований. Особое место в исследованиях подобного рода занимает изучение иммунной системы костного мозга, роль которой до недавнего времени недооценивалась.

Костный мозг, являясь центральным органом гемопоэза и иммунопоэза, играет важную роль в канцерогенезе, и, в частности, гематогенном метастазировании опухолей. Он становится пристанищем для выживших в системном кровотоке опухолевых клеток, которые, появляясь в результате клональной селекции, оказываются резистентными к проводимым традиционным лекарственным воздействиям и успешно выживают в новом микроокружении, адаптируясь к его особенностям и приводя к метастазированию спустя годы стойких ремиссий [Тупицын Н.Н., 2020, Goldberg J., 2021, Feng Z., 2022]. В этой связи одним из приоритетных направлений в настоящее время стали исследования в отношении иммунореактивности костного мозга при раке.

Одно из центральных мест в противоопухолевой защите занимают эффекторныe клетки иммунитета, осуществляющие контроль за ростом опухоли на всех этапах ее развития, включая метастазирование [Gerada Ch., 2020, Batalha, S., 2021, Henriksen J. R., 2020]. Результатов исследований относительного содержания этих клеток среди циркулирующих лимфоцитов при опухолях женской репродуктивной системы насчитывается немало. Публикаций, касающихся изучения костного мозга при опухолях негематопэтической природы, практически нет, хотя именно в костном мозге происходит на начальных этапах генерация НК-клеточных и В-линейных эффекторов противоопухолевого иммунитета, а в дальнейшем накопление Т-клеточных эффекторов противоопухолевого иммунитета и клеток памяти. Из экспериментальных данных известно, что костномозговые лимфоциты эффективнее подавляют опухолевый рост, чем Т-лимфоциты периферической крови [Дейчман Г.И., 2000]. В клинических исследованиях установлены различия субпопуляционного состава лимфоидных клеток костного мозга при саркомах у детей по сравнению со здоровыми донорами [Горбунова Т.В., 2014]. Отмечено, что характерным при рабдомиосаркоме у детей является повышение уровней активированных Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+HLA-DR+), зрелых $\gamma\delta$ Т-клеток, снижение количества Т-хелперных клеток (CD4+), экспрессирующих молекулу адгезии CD62L (Leu8). Интересным фактом стало обнаружение гетерогенности экспрессии CD57 и CD28 цитотоксическими Т-лимфоцитами. Авторами выявлена прогностическая значимость отдельных субпопуляций лимфоцитов костного мозга.

Несколько исследований, посвященных изучению субпопуляционного состава клеток-эффекторов в костном мозге при раке молочной железы, свидетельствуют о том, что

иммунокомпетентные клетки могут играть важную роль в предотвращении развития микрометастатических очагов. Согласно полученным в этих работах данным, наблюдается изменение пропорции эффекторных клеток не только по сравнению со здоровыми донорами, но и при поражении костного мозга [Solomayer E.F., 2003, Feuerer M. 2001, Carietto A.H., 2014, Рябчиков Д.А., 2018]. Так, Feuerer M. и соавт. сообщают о том, что при обнаружении микрометастазов в костном мозге увеличен уровень содержания субпопуляций CD4+, CD8+, CD56+ клеток.

Интригующим фактом стало обнаружение взаимосвязи костномозговых цитотоксических CD4+Т-клеток (CD4+Perforin+), эффекторных Т-клеток памяти (CD27+Perforin+) с гистологическим видом опухоли, которая выявлена при немелкоклеточном раке легкого [Тупицын Н.Н., 2020].

В литературе встречается довольно много работ в отношении лимфоцитарных популяций, инфильтрирующих опухоль. Многочисленные исследования, проведенные при различных видах злокачественных новообразований, в том числе при раке молочной железы и раке яичников, сообщают о высоком уровне корреляции между интенсивностью инфильтрации опухоли лимфоцитами и выживаемостью больных, эффективностью лечения, но при этом много противоречий возникает при оценке предикторной роли различных субпопуляций лимфоцитов [De Groot A. F., 2019, Li J., 2017, Denkert C., 2018]. Единой точки зрения на этот счет нет. Предлагается рассматривать степень инфильтрации опухоли иммунокомпетентными клетками не только как прогностический фактор, но и как основание для подбора индивидуализированного лечения.

Таким образом, изучение субпопуляций эффекторных клеток противоопухолевого иммунитета в костном мозге, а также в первичной опухоли наряду с особенностями иммунофенотипа злокачественных клеток опухолей женской репродуктивной системы является принципиально важным и чрезвычайно актуальным, поскольку в перспективе может стать основой для разработки и совершенствования лечебных подходов, направленных на нормализацию и поддержание иммунологической реактивности организма больного.

Цель исследования

Комплексная оценка особенностей интралимфоцитарных иммунных реакций и иммунной системы костного мозга при опухолях женской репродуктивной системы и анализ их клинической значимости.

Задачи исследования

1. Представить характеристику интратуморальных иммунных реакций при опухолях женской репродуктивной системы в зависимости от иммунофенотипического портрета опухоли.

2. Выполнить детальный анализ взаимосвязи клинических и морфологических показателей с иммунофенотипом опухолей женской репродуктивной системы и видами интратуморальных иммунных реакций.

3. Изучить клиническое значение иммунологических параметров при опухолях женской репродуктивной системы на основе иммунофенотипа первичной опухоли и интратуморальных иммунных реакций.

4. Провести сравнительную оценку эффекторных лимфоцитарных популяций в первичном очаге поражения и костном мозге у больных опухолями женской репродуктивной системы.

5. Дать подробную характеристику особенностей морфологически выявляемых клеточных типов костного мозга у больных опухолями женской репродуктивной системы.

6. Определить наиболее значимые эффекторные популяции лимфоцитов костного мозга и оценить их особенности в зависимости от клинико-морфологических параметров у больных опухолями женской репродуктивной системы.

7. Дать детальную оценку взаимосвязи эффекторных популяций лимфоцитов костного мозга с особенностями миелограмм у больных опухолями женской репродуктивной системы.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в лаборатории иммунологии гемопоэза отдела клинико-лабораторной диагностики НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с использованием морфологического, иммунофлуоресцентного, проточно-цитометрического методов. Иммуноцитометрический анализ проводился с применением моноклональных антител, напрямую меченых различными флуорохромами. Изучение образцов первичной опухоли и костного мозга выполнено у 428 больных опухолями женской репродуктивной системы (рак шейки матки, рак тела матки, рак яичников, рак молочной железы), которые получали лечение в ФГБУ «НМИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Проведен ретроспективный анализ результатов лечения больных опухолями женской репродуктивной системы в сравнении с полученными данными исследований иммунопоэза. Статистический анализ осуществлен на основе стандартных математических программ SPSS, v. 23. Для сравнения непараметрических критериев использовали t-критерий Стьюдента, тест

Манна-Уитни, Краскела-Уоллеса. Для сравнения качественных параметров – таблицы сопряженности, критерий Фишера или тест χ^2 по Пирсону. Для оценки выживаемости применяли метод Kaplan-Meier, регрессионный анализ Кокса.

Научная новизна

Впервые выполнено комплексное иммуноморфологическое исследование опухолей женской репродуктивной системы.

Исследована взаимосвязь комплекса иммунофенотипических признаков (молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-I, HLA-DR, трансферриновых рецепторов 1 (TfR1), молекул интегринов CD29 (VLA – β 1), FAS/APO лиганда CD95, муциноподобного антигена MUC-1, молекул адгезии CD54 и CD56, гликопротеина MRD/Pgp170) с клиническими и морфологическими параметрами опухолей женской репродуктивной системы.

Установлена связь HLA-DR, TfR1, CD95, CD54, CD29 иммунофенотипа опухолей женской репродуктивной системы с видом интратуморальных иммунных реакций.

Охарактеризованы морфологически выявляемые клеточные типы костного мозга у больных опухолями женской репродуктивной системы. Впервые установлены корреляции показателей миелограммы с лимфоцитарными популяциями и клинико-морфологическими параметрами у больных опухолями женской репродуктивной системы.

Впервые изучены эффекторные популяции костного мозга (цитотоксические клетки CD45+Perforin+, включая перфорин-содержащие CD4+клетки, TCR- $\gamma\delta$, эффекторные CD27+клетки памяти, регуляторные Т-клетки CD4+CD25+, CD8+CD25+, CD5+B1-клетки) и установлены их взаимосвязи с клиническими и морфологическими параметрами у больных опухолями женской репродуктивной системы.

Теоретическая и практическая значимость

Проведенный сравнительный анализ эффекторных звеньев иммунопоэза у больных опухолями женской репродуктивной системы выявил взаимосвязи интратуморальных иммунных реакций с иммунофенотипом опухолей, установлены иммуноморфологические особенности костного мозга. Это дополняет картину представлений о биологии рака, позволяет глубже понять взаимоотношения «опухоль-организм». Новые пути понимания процессов иммунологической реактивности стали основанием для выделения иммунологических маркеров, ассоциированных с выраженностью иммунных реакций опухоли. Кроме того, результаты исследования открывают новые направления поиска для иммунотерапевтического воздействия на опухоли женской репродуктивной системы.

Личный вклад

Автором подробно изучена мировая и отечественная литература по теме научной работы, что позволило сформулировать концепцию и дизайн исследования. Автором выполнены морфологические исследования костного мозга, проточно-цитометрический анализ лимфоидных популяций костного мозга, иммуногистохимическое исследование (иммунофлуоресцентная микроскопия) образцов опухолей женской репродуктивной системы.

Также автором осуществлялась работа с медицинской документацией, создание базы данных, статистический анализ результатов лечения в параллели с полученными данными исследований иммуноопеэза.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия. Направление исследований: пункт 2. Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.).

Положения, выносимые на защиту

Комплексное многопараметровое изучение эффекторных звеньев иммуноопеэза позволяет выявить сложную структуру иммунологических связей первичного очага с системой иммуноопеэза. Иммунофенотип (HLA-DR, TfR1) опухолей взаимосвязан со стадией, размером опухоли, степенью злокачественности. Иммунофенотипические параметры опухоли оказывают влияние на характер интратуморальных реакций и находятся во взаимосвязи с ними.

Интратуморальные Т-клеточные реакции опухолей женской репродуктивной системы являются ведущими и коррелируют с ранними стадиями, тогда как В-клеточные и плазмноклеточные преобладают на поздних стадиях опухолевого процесса. Выраженность и характер инфильтрации в строме и паренхиме опухоли различаются. НК-клеточные реакции в паренхиме опухоли являются доминирующими при раке яичников. При раке шейки матки наблюдается выраженный уровень В-клеточных реакций стромы.

Экспрессия молекул HLA-DR при раке молочной железы, раке шейки матки коррелирует с ранними стадиями.

Экспрессия трансферриновых рецепторов (TfR1), молекул HLA-DR часто наблюдается при отсутствии экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона клетками рака молочной железы. Экспрессия FAS/APO лиганда CD95 и молекул адгезии CD54 имеют связь со стадией,

размером первичной опухоли при раке молочной железы. Экспрессия FAS/APO лиганда CD95 связана с гистологическим видом рака молочной железы.

При раке тела и раке шейки матки мономорфная экспрессия рецепторов трансферрина сопровождается более выраженным уровнем общелейкоцитарных (CD45+) реакций стромы.

Иммунорфологическое исследование костного мозга позволяет выявить клеточные и иммунологические изменения гемопоэза и лимфопоэза. Показатели гемопоэза и лимфопоэза достоверно связаны с клинико-морфологическими параметрами рака молочной железы, рака яичников.

Увеличение распространенности рака молочной железы, рака яичников сопровождается снижением числа миелоидных предшественников, нарастанием пропорции терминальных форм эритроидного ростка. Увеличение доли CD19+CD5+В-клеток врожденного иммунитета, CD19+CD10+ В-предшественников костного мозга наблюдается при нарастании стадии рака молочной железы.

Миелоидные предшественники находятся в отрицательной корреляции с костномозговыми популяциями Т-клеток CD4+CD25+, CD8+HLA-DR+ при раке молочной железы, популяциями CD3+CD4+, CD4+Granzim+, CD45+Granzim+/Perforin+ при раке яичников. Эритроидные предшественники находятся в отрицательной связи с НК-клетками костного мозга при раке молочной железы.

Эффекторные популяции лимфоцитов костного мозга находятся в отрицательной связи с интраутеральными иммунными реакциями опухолей женской репродуктивной. Содержание В-предшественников (CD19+CD10+) и В1-клеток врожденного иммунитета (CD19+CD5+) взаимосвязано субпопуляций Т-клеток (CD4+, CD8+) в опухолевой ткани при раке молочной железы.

Внедрение результатов исследования

Полученные в работе результаты внедрены и используются в повседневной диагностической практике лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России для персонализации лечебных и диагностических подходов у больных с опухолями женской репродуктивной системы.

Полученные сведения диссертационной работы включены в семинарские занятия, лекционные темы по персонализации лечебных и диагностических подходов у больных с опухолями женской репродуктивной системы, и таким образом используются в повседневной образовательной деятельности кафедры онкологии и лучевой терапии лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Апробация

Апробация диссертации состоялась на совместной научной конференции лаборатории иммунологии гемопоза и лаборатории клинической иммунологии отдела клинко-лабораторной диагностики, онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) №1, онкологического отделения хирургических методов лечения №8 (онкогинекологии), хирургического отделения №16, онкологического отделения хирургических методов лечения № 15 (комбинированного лечения опухолей молочной железы) НИИ клинической онкологии; лаборатории биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей и лаборатории иммунофармакологии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, кафедры онкологии и лучевой терапии лечебного факультета ФГАОУ ВО «РНИМУ им Н.И. Пирогова» Минздрава России, кафедры онкологии и паллиативной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, состоявшейся «12» мая 2023 года.

Материалы исследования доложены на следующих научных конференциях:

- XIII International International Eurasian Hematology-Oncology Congress, Стамбул, Турция, 5-8 октября 2022 г. Тема доклада: «Immunophenotypic features of breast cancer molecular subtypes».

- 6th Cancer World Congress, Lisbon, Португалия, 28-30 сентября 2022 г. Тема доклада: «B-1 lymphocytes in the antitumor response».

- EACR 2022 Congress - Innovative Cancer Science: Translating Biology to Medicine, Seville, Испания, 20-23 июня 2022 г. Тема доклада: «B1-cells of innate immunity in the bone marrow in breast cancer»

- XII International Eurasian Hematology-Oncology Congress, Стамбул, Турция, 10-13 ноября 2021г. Тема доклада: «B1-cells of innate immunity in the bone marrow in breast cancer patients: identification and their relationship with clinical and morphological parameters».

- ESCCA 2021 Virtual Conference Нидерланды, 22-24 апреля 2021 г. Тема доклада: «B1-cells of innate immunity in the bone marrow in patients with breast cancer».

Публикации

Материалы диссертационного исследования изложены в полном объеме в 15 публикациях, из них 13 в научных журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов исследований, получено 2 свидетельства о государственной регистрации базы данных.

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 415 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований по каждой нозологии, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 230 таблицами и 91 рисунком. Список литературы представлен 266 источниками зарубежной и отечественной литературы.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клиническая характеристика больных

Материалом для исследования явились образцы первичной опухоли и костного мозга 428 больных опухолями женской репродуктивной системы, которые прошли обследование и получили лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2002г. по 2022г. Диагноз установлен по результатам комплексного стандартного обследования, включающего маммографию, УЗИ молочных желез и зон регионарного метастазирования, УЗИ органов брюшной полости и малого таза, КТ и МРТ органов малого таза и органов брюшной полости, рентгенографию органов грудной клетки, сцинтиграфию костей скелета, гастроскопию, морфологическое и иммуногистохимическое исследования опухоли, определение уровня онкомаркера СА125.

Возраст больных раком молочной железы варьировал от 27 до 79 лет и в среднем составил 54,1 года. Распределение больных в соответствии с клинической стадией было следующим: у 38 (19%) больных диагностирована I стадия, у 54 (27%) – IIА стадия, у 63 (31,5%) – IIВ стадия, IIIА – у 18 (9,0%) больных, IIIВ – в 19 (9,5%) случаях, и в 8 случаях (4,0%) – IIIС стадия. Степень распространенности согласно классификации TNM представлена в таблице 1. Преимущественно размеры первичной опухоли соответствовали стадии T2, что отмечено в 117 (58,5%) случаев, чаще наблюдался N+ статус.

Таблица 1 – Распределение больных раком молочной железы в соответствии с классификацией TNM

Индекс T	n	(%)
T1	59	29,5
T2	117	58,5
T3	5	2,5

Продолжение таблицы 1

T4	19	9,5
Индекс N		
N0	75	37,5
N1	90	45,0
N2	24	12,0
N3	11	5,5
Итого	200	100,0

Преобладала протоковая аденокарцинома, $n = 143$, 71,5% (Рисунок 1). Редкие виды рака (медулярный рак, тубулярный, слизистый) выявлены в 7% случаев. У большинства больных рак молочной железы соответствовал умеренной дифференцировке G2, что составило 77,8% ($n = 133$), степень дифференцировки G1 установлена в 7 (4,1%) случаях, G3 – в 18,1% ($n = 31$).



ИИП – инфильтративно-протоковый рак, ИИДР – инфильтративно-дольковый рак

Рисунок 1 – Гистологические типы рака молочной железы

Рецепторы эстрогенов в опухоли экспрессировались в 55,0% ($n = 110$) случаев, рецепторы прогестерона – в 50,0% ($n = 101$) наблюдений. Суррогатный подтип рака молочной железы выделяли на основании экспрессии опухолью рецепторов эстрогенов и прогестерона. Люминальный рак молочной железы выявлен в 61,5% ($n = 123$) случаев, нелюминальный – в 38,0% ($n = 77$). Также учитывалось деление на суррогатные подтипы в зависимости от экспрессии опухолью только рецепторов эстрогенов: люминальный рак молочной железы – 55,0% ($n = 110$) случаев, нелюминальный подтип – 45,0% ($n = 90$). У 119 больных разделение по подтипам проводилось на основании экспрессии Her2-neu, Ki-67, рецепторов эстрогенов и прогестерона: люминальный А – 26,9 % ($n = 32$), люминальный В подтип Her2/neu «-» – 27,0% ($n = 41$), люминальный В Her2/neu «+» – 8,4% ($n = 10$), Erb2+ – 11,8% ($n = 14$), трижды негативный – 18,5% ($n = 22$).

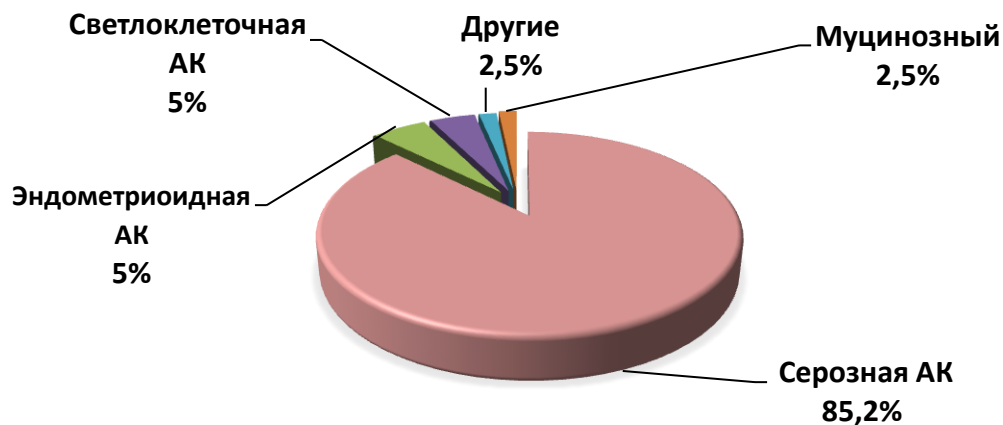
Всем больным раком молочной железы выполнено хирургическое вмешательство. Мастэктомия выполнялась у 50,0% (n = 100) больных, а в остальных случаях проведена резекция молочной железы. Химиотерапию в неоадьювантном режиме получили 15,5% (n = 31) больных, в адьювантном – 84,5% (n = 169) пациенток. Схемы химиотерапии, применявшиеся в лечении больных раком молочной железы, были следующие: АС, АС + таксаны, АС + Трастузумаб, АС + Трастузумаб + Паклитаксел, Паклитаксел + Трастузумаб, Таксотер + Циклофосфан, САФ, СМФ, СМФ VP. Гормонотерапия проводилась в 15,5% случаев ингибиторами ароматазы, в 46,0% – тамоксифеном. Лучевое лечение в послеоперационном периоде получили 43% (n = 77) больных.

Возраст больных раком яичников варьировал от 29 до 81 года и в среднем составил 53,8 лет. Распределение в соответствии с клинической стадией представлено в таблице 2. Преобладала III стадия – 61,4% (n = 75).

Таблица 2 – Распределение больных раком яичников по стадиям заболевания

Клиническая стадия	n	(%)
I	18	14,8
II	7	5,7
III	75	61,4
IV	22	18,0
Итого	122	100,0

В большинстве случаев выявлена серозная аденокарцинома: n = 104 (85,2%), у 17 (14,7%) больных наблюдались редкие виды рака (муцинозный, эндометриоидный, светлоклеточный) (Рисунок 2).



АК – аденокарцинома

Рисунок 2 – Гистологические типы рака яичников

По характеру строения опухоль в большинстве случаев носила кистозно-солидный характер (69,7%, n = 85). В 32 случаях (26,2%) опухоль имела солидное строение, а у 3 больных – железистое строение. Асцит наблюдался в 59,8% (n = 73) случаев.

Степень злокачественности рака яичников определена в 93 случаях: high grade аденокарцинома установлена в 87,0% (n = 81) наблюдений, low grade аденокарцинома отмечена в 13,0% (n = 12) наблюдений.

Исходный уровень онкомаркера СА-125 в сыворотке крови варьировал от 16,0 до 125500 МЕ/мл, в среднем составив $2560,6 \pm 1225,6$ МЕ/мл.

Первичный рак яичников установлен в 77,8% (n = 95) случаев: I стадия – 15 (15,7%), II стадия – 5 (5,2%), III стадия – 57 (60,0%), IV стадия – 18 (18,9%), асцит – 59 (62,1%), плеврит – 12 (12,6%). Серозная аденокарцинома наблюдалась у 81 больной (85,2%): high grade – 68 (83,9%), low grade – 11 (13,5%).

Рецидивный рак яичников установлен в 22,2% (n = 27): I стадия – 3 (11,2%), II стадия – 2 (7,4%), III стадия – 18 (66,6%), IV стадия – 4 (14,8%), асцит – 14 (51,8%), плеврит – 3 (11,1%). Серозная аденокарцинома отмечена в 23 случаях (85,1%): high grade – 13 (56,5%), low grade – 1 (4,3%).

Хирургическое вмешательство выполнено 115 больным. Полная циторедуктивная операция проведена 19 больным (16,0%), оптимальная циторедуктивная операция – 37 (31,4%) больным, субоптимальная циторедуктивная операция – 59 (52,6%) больным. Расширенная экстирпация матки с придатками и резекцией большого сальника проведена 85 (69,6%) больным. В 7 случаях (5,7%) выполнена только экстирпация матки с придатками, у 8 (6,5%) больных – двусторонняя овариоэктомия с удалением большого сальника, в 3 (2,4%) случаях – только аднексэктомия, в 11 случаях (9,0%) выполнено комбинированное вмешательство (включало операцию Гартмана или резекцию тонкой кишки). При первичном раке яичников полная циторедуктивная операция выполнена 2 больным (2,0%), оптимальная циторедуктивная операция – у 23 (24,2%) больных, субоптимальная циторедуктивная операция – у 47 (49,4%) больных. При рецидивном раке яичников оптимальную циторедуктивную операцию удалось выполнить у 14 (51,8%) больных, субоптимальную циторедуктивную операцию – у 12 больных. Химиотерапию в адьювантном режиме получили 65,4% (n = 70) больных, неоадьювантное + адьювантное лечение – 19,6% (n = 21) пациенток. В 16 случаях проводилась лечебная полихимиотерапия. Большинству больных лечение проводилось по схеме Паклитаксел + Карбоплатин, что составило 46,7% (n = 57). Только Карбоплатин использовался в 20 случаях (16,3%). В двух случаях пациенткам проводилось лечение по схеме Паклитаксел + Карбоплатин + Бевацизумаб. У двух больных использовали комбинацию Иринотекана с препаратами платины. В остальных случаях применялись платиносодержащие схемы без таксанов.

Возраст больных раком шейки матки варьировал от 28 до 74 лет и в среднем составил 46,4 года. Распределение больных в соответствии с классификацией по FIGO было следующим: у 26 (43,3%) больных была диагностирована IA1 - IB1 стадия рака шейки матки, у 15 (25,0%) больных выявлена опухоль IB2 - IIA стадии, в 19 случаях (31,7%) опухоль соответствовала IIB - IV стадии. Степень распространенности рака шейки матки согласно классификации TNM представлена в таблице 3. В большинстве случаев отмечена стадия T1, статус N0.

Таблица 3 – Распределение больных раком шейки матки в соответствии с международной классификацией TNM

Индекс T	N	(%)
T1	42	69,3
T2	15	25,0
T3	4	6,7
Индекс N		
N0	43	71,7
N1	12	20,0
Nx	6	9,3
Индекс M		
M0	61	100,0

В большинстве случаев выявлен плоскоклеточный рак шейки матки: $n = 50$, 84,0%. В остальных 7 (12,0%) случаях наблюдались аденокарцинома и другие виды рака (4,0%) (Рисунок 3).

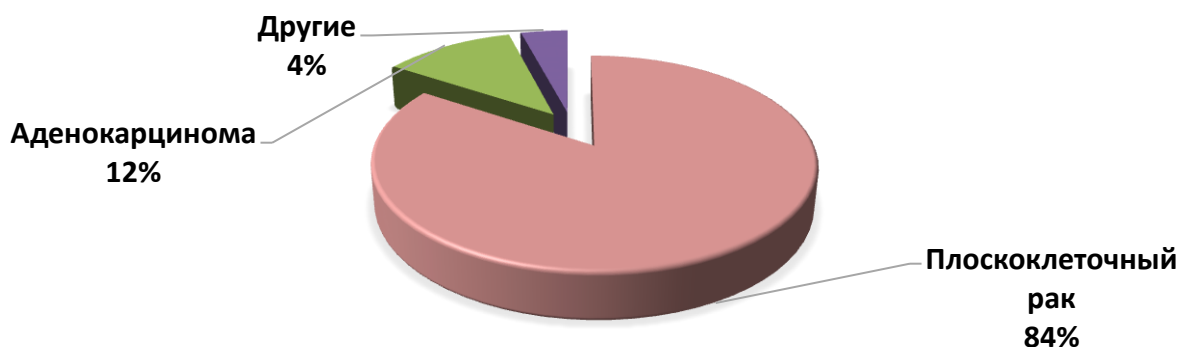


Рисунок 3 – Гистологические типы рака шейки матки

Степень злокачественности рака шейки матки определялась в 52 случаях. У большинства больных рак шейки матки соответствовал умеренной степени дифференцировки (G2), что составило 48,1% (n = 25), степень G1 установлена в 38,5% (n = 20) случаев, а низкодифференцированные опухоли (G3) отмечены в 13,5% (n = 31) наблюдений. Глубина инвазии опухоли более 5 мм установлена в 86,7% (n = 52) случаев, менее 5 мм – у 13,3% (n = 8) больных, в одном случае – нет данных.

Объем хирургического вмешательства в большинстве случаев соответствовал расширенной экстирпации матки с придатками с лимфаденоэктомией, что составило 67,2% больных. В одном случае выполнена трахелэктомия с лимфаденоэктомией. У 7% (n = 4) больных проводилась расширенная экстирпация матки с придатками и транспозиция яичников. Из всех больных 16 подверглись химиолучевому лечению, из них в 3 случаях на первом этапе выполнена операция. В 4 случаях больные предпочли лечение по месту жительства, в этой связи точные данные об объеме вмешательства в архиве отсутствуют.

Возраст больных раком тела матки варьировал от 40 до 83 лет и в среднем составил 57,5 лет. Распределение больных раком тела матки в соответствии с классификацией по FIGO было следующим: у 33 (73,3%) больных была диагностирована опухоль IA-IB стадии, у 2 (4,4%) больных выявлен рак тела матки II стадии, в 7 случаях опухоль соответствовала III стадии, и в 2 наблюдениях – IV стадии (Таблица 4).

Таблица 4 – Распределение больных раком тела матки по стадиям заболевания

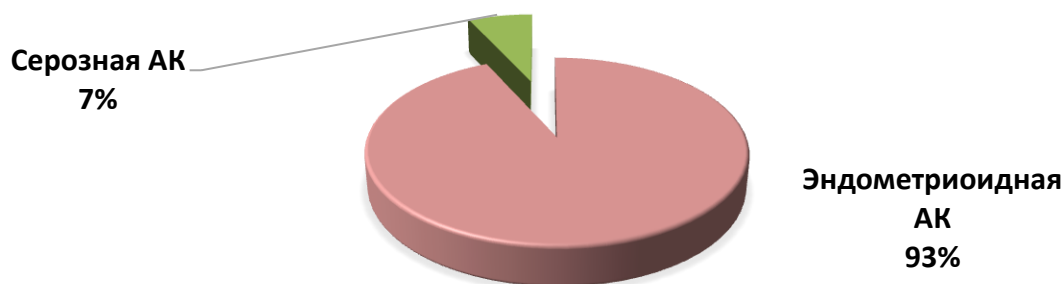
Клиническая стадия	n	(%)
IA	19	42,2
IB	14	31,1
II	2	4,4
IIIA	2	4,4
IIIB	2	4,4
IIIC	3	6,7
IV	2	4,4
Итого	45	100,0

Распространенность опухоли согласно классификации TNM представлена в таблице 5. Размеры первичной опухоли чаще соответствовали стадии T1, преимущественно без поражения регионарных лимфатических узлов.

Таблица 5 – Распределение больных раком тела матки в соответствии с международной классификацией TNM

Индекс T	N	(%)
T1	36	81,8
T2	2	4,5
T3	6	13,6
Индекс N		
N0	38	84,4
N1	6	13,3
Nx	1	2,3
Индекс M		
M0	45	100,0

В большинстве случаев выявлена эндометриоидная аденокарцинома: $n = 41$, 93,2% (Рисунок 4). Степень злокачественности рака тела матки определялась в 42 случаях. У большинства больных опухоль была умеренно дифференцирована (G2), что составило 39,5%, $n = 17$. Высокодифференцированная аденокарцинома (G1) установлена в 34,9% ($n = 15$) случаях, опухоли с дифференцировкой G3 наблюдались в 20,9% ($n = 9$).



АК – аденокарцинома

Рисунок 4 – Гистологические типы рака тела матки

Инвазия опухолью $< \frac{1}{2}$ миометрия установлена в 46,5% ($n = 20$) случаев, инвазия $> \frac{1}{2}$ миометрия отмечена в 46,5% ($n = 20$), не отмечено инвазии в миометрий в 7% наблюдений.

Хирургическое вмешательство выполнено 44 больным. В подавляющем большинстве случаев пациенткам выполнялась расширенная экстирпация матки с придатками с лимфаденоэктомией, что составило 63,6% наблюдений. Операция в сочетании с химиолучевой

терапией проведена 20,5% больным ($n = 9$), операция в сочетании с лучевой терапией – 15,9% ($n = 7$).

Всем больным с целью получения костного мозга выполнена стерильная пункция. Манипуляцию проводили до начала лечения больных. Все пациенты подписывали информированное согласие на проведение данной процедуры.

Морфологическое исследование костного мозга

Морфологическое исследование костного мозга выполнено в лаборатории иммунологии гемопоеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клеточность костного мозга подсчитывалась на анализаторе Micros-60 Horiba, USA. На предметных стеклах приготавливали по 6 мазков костного мозга, которые затем фиксировали в готовом красителе Май-Грюнвальда и выполняли окрашивание мазков по методу Романовского.

После окрашивания препараты подвергались микроскопии двумя независимыми экспертами врачами морфологами (микроскоп ZEISS, AXIOSKOP, Германия). Проводился подсчет клеточных элементов каждого ростка костного мозга, расчет индексов миелограммы (индекса созревания эритрокариоцитов, индекса созревания нейтрофилов, соотношение лейкоцитов и эритроцитов). Полученные данные были сопоставлены с общепринятой в настоящее время гематологической нормой по А.И. Воробьеву. В исследование включались миелограммы, в которых было исключено разбавление периферической кровью.

Имунофенотипирование лимфоидных популяций костного мозга

Имунофенотипирование лимфоидных популяций костного мозга выполнено в лаборатории иммунологии гемопоеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России методом многопараметровой проточной цитометрии. Костный мозг для иммунологического исследования собирался в пробирки, импрегнированные ЭДТА. Для устранения примеси эритроцитов использовали раствор лизира. Лизирующий раствор вносили в пробирку с костным мозгом и инкубировали в течение 8-10 минут при комнатной температуре в темноте. Затем клеточную суспензию отмывали буферным раствором. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали. Готовую клеточную суспензию переносили в пробирки, в которые добавляли по 2-5 мкл меченых моноклональных антител в соответствии с панелью. В пробирках, предназначенных для изучения перфорин/гранзим содержащих популяций клеток, проводили этап пермеабилитации. Инкубация с антителами проводилась в течение 30 минут. Затем клеточную суспензию отмывали буферным раствором PbS. Сбор клеток выполняли на проточном цитометре FACSCanto II, программное обеспечение BD FACSDiva с функцией автоматического расчета значений компенсации используемых флуорохромов по

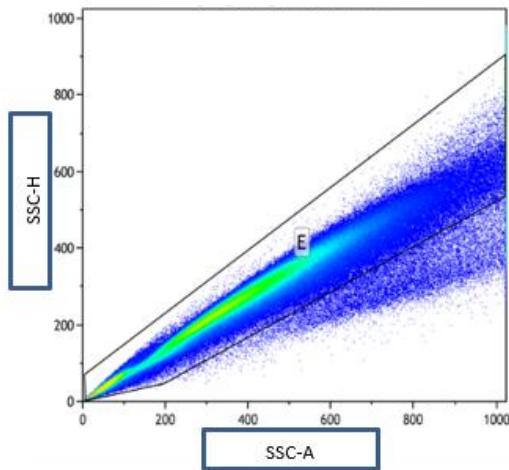
одноцветным компенсационным контролем. Для каждой пробы собирали не менее 200.000 событий. В таблице 6 приведен список антител, которые применяли в работе.

Таблица 6 – Моноклональные антитела для иммунофенотипирования лимфоцитов костного мозга

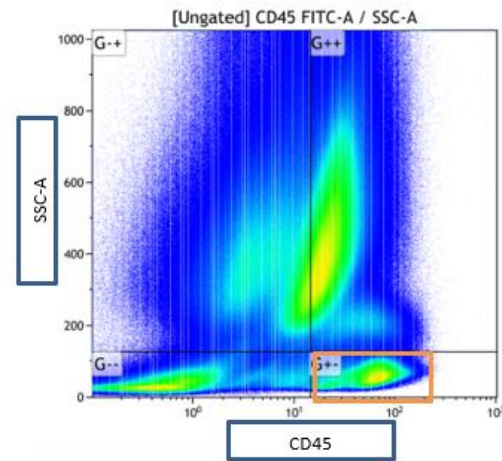
№	Антитело	Флуоресцентная метка	Производитель
1	CD45	V500-A, V450, PerCP	Becton Dickinson, США
2	CD3	APC,	Becton Dickinson, США
3	CD4	V450	Becton Dickinson, США
4	CD8	APC -H7	Becton Dickinson, США
5	CD5	FITC	Becton Dickinson, США
6	CD2	FITC	Becton Dickinson, США
7	CD7	APC, FITC, PE	Becton Dickinson, США
8	CD19	FITC, PE	Becton Dickinson, США
9	CD20	APC -H7	Becton Dickinson, США
10	CD16	FITC, PE	Becton Dickinson, США
11	CD56	PerCP	Becton Dickinson, США
12	CD25	V450	Becton Dickinson, США
13	CD27	APC, FITC, PE	Becton Dickinson, США
14	CD28	APC, FITC, PE	Becton Dickinson, США
15	TCR гамма\дельта	FITC	Becton Dickinson, США
16	CD10	FITC	Becton Dickinson, США
17	CD38	PerCP	Becton Dickinson, США
18	CD45RO	V450	Becton Dickinson, США
19	CD45RA	APC	Becton Dickinson, США
20	HLA-DR	FITC, PE	Becton Dickinson, США
21	Perforin	FITC	Becton Dickinson, США
22	Granzim	PE	Becton Dickinson, США

Лимфоциты гейтировали в координатах FSC/SSC в соответствии с размером и зернистостью. Данные вычисляли на основе дот-блотов в виде процентов клеток, положительно окрашенных для целевых маркеров в изучаемой популяции. Оценка экспрессии целевых

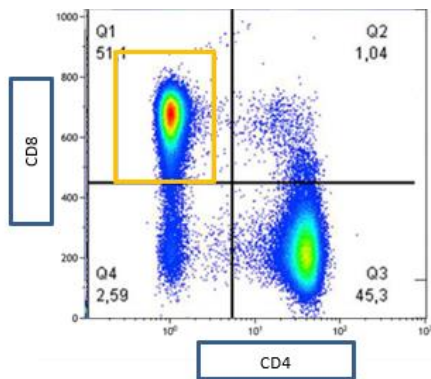
маркеров выполнялась с помощью программы Kaluza Analysis v2.1 (Beckman Coulter, USA). Субпопуляционный состав костного мозга изучался в гейте зрелых лимфоцитов, на основании выраженной экспрессии CD45 в сочетании с низкими характеристиками бокового светорассеяния (SSC). Пример анализа лимфоцитарных субпопуляций костного мозга приведен на рисунке 5.



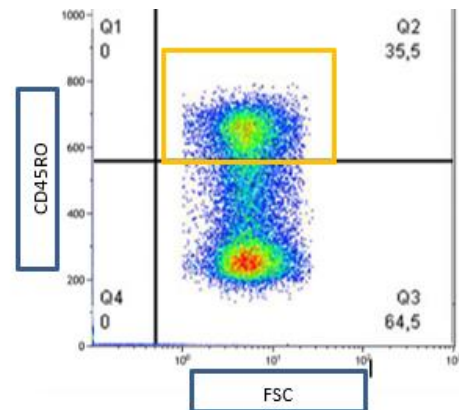
А - Выделение синглетов
Выставлен параметр бокового светорассеяния лазерного луча, который регистрирует гранулярность клетки



Б - Общее количество CD45+ клеток в образце костного мозга
По оси абсцисс отмечена экспрессия CD45, а по оси ординат – выставлен параметр бокового светорассеяния лазерного луча. Гейт CD45+ выделен желтым контуром



В - Популяция CD8+ клеток в образце костного мозга
По оси абсцисс отмечена экспрессия CD4, по оси ординат экспрессия CD8. Гейт CD8+ выделен желтым контуром. Популяция CD8+ лимфоцитов составляет 51,1%



Г - Популяция CD45+CD8+CD45RO+ клеток в образце костного мозга.
По оси абсцисс выставлен параметр FSC, по оси ординат экспрессия CD45RO. Популяция CD45RO+ клеток выделена желтым контуром, ее число в гейте CD8+ составляет 35,5%

Рисунок 5 – Анализ лимфоцитарных субпопуляций костного мозга

В данном случае показан анализ CD45+CD8+CD45RO+ популяций лимфоцитов. Первым этапом выполнялось гейтирование по SSC: выделяются синглеты (Рисунок 5-А). Вторым этапом проводилось гейтирование по CD45: выделяется популяция клеток, экспрессирующих пан-лейкоцитарный маркер CD45/SSC^{low} (Рисунок 5-Б). Далее в пределах гейта CD45+ анализировались целевые маркеры, рисунок 5-В, Г.

Иммунофенотипирование первичной опухоли

Иммунофенотипирование первичной опухоли больных выполнено в лаборатории иммунологии гемопозза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Применялся метод иммунофлуоресценции на криостатных срезах. Образцы опухоли в случае проведения неoadьювантного лечения рака молочной железы получены путем core-биопсии до начала лечения. В остальных случаях для изучения иммунофенотипа опухоли использован операционный материал. При раке шейки матки подвергнут изучению операционный материал, а при планировании химио-лучевой терапии до начала лечения осуществлялась биопсия опухоли с обязательным гистологическим исследованием. При раке яичников, раке тела матки изучен операционный материал.

Из каждого образца опухоли готовили срезы 4-6 мкм, которые после фиксации ацетоном отмывали, окрашивали немечеными моноклональными антителами. После отмывания наносились ФИТЦ-меченные F(ab)₂ – фрагменты антивидовых антител IgG1. По окончании инкубации препараты отмывали и наносили раствор глицерина. Учет реакции проводили на люминисцентном микроскопе ZEISS (AXIOSKOP; Германия).

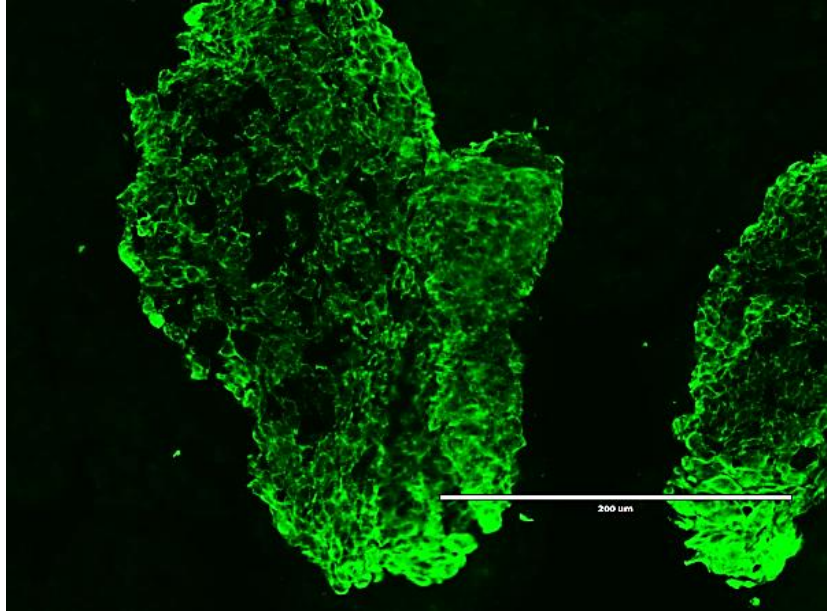
Изучена экспрессия опухолевыми клетками панцитокератина (KL-1), молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA-I, HLA-DR), трансферринового рецептора 1 (TfR1), молекул интегринов CD29 (VLA – β1), FAS/APO лиганда CD95, муциноподобного антигена MUC-1, молекулы адгезии CD54 и CD56, гликопротеина MRD/Pgp170.

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 et al.:

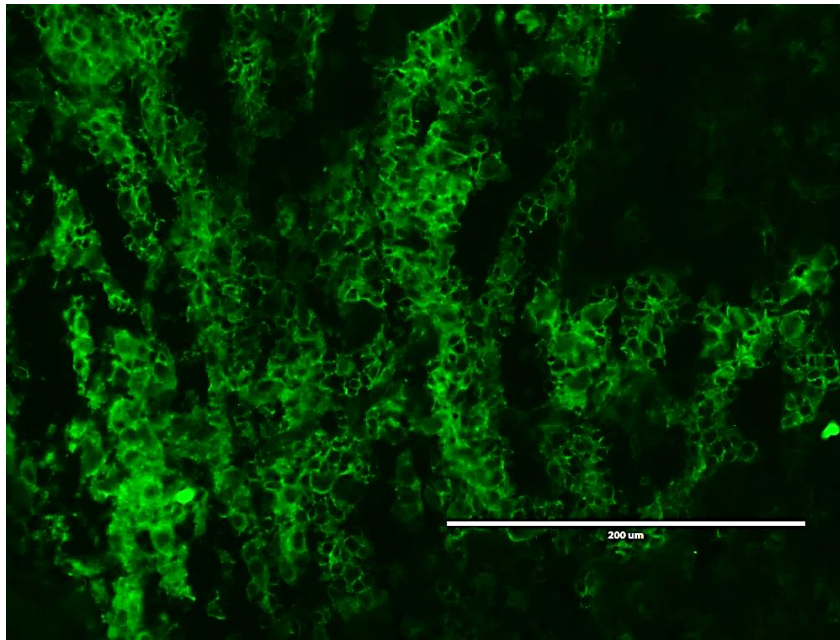
1. Отрицательная реакция – менее 10% антигенположительных клеток;
2. Мозаичная реакция – антиген экспрессируется частью опухолевых клеток (10-80%);
3. Мономорфная реакция – экспрессия анализируемого антигена наблюдается более чем 80% опухолевых клеток.

При изучении местных иммунных реакций в опухоли оценивали общелейкоцитарную инфильтрацию (CD45), плазмоцитарную инфильтрацию (CD38), Т-клеточную (CD3, CD4, CD8, CD25) и В-клеточную (CD20) инфильтрацию, а также гистиоцитарную (D11).

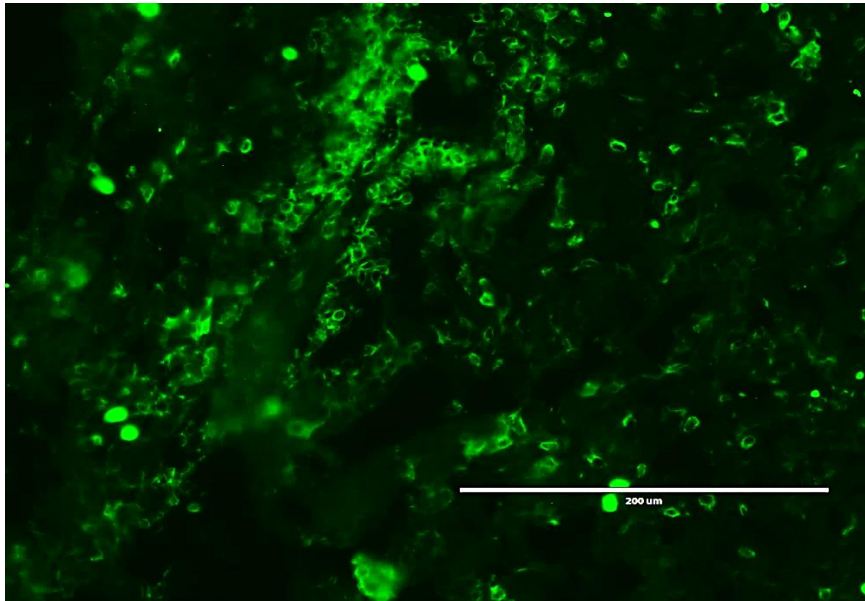
Пример инфильтрации опухоли лимфоидными клетками представлен на рисунке 6.



А - Окрашивание среза опухоли антителом KL-1 (панцитокератин) – все клетки опухоли KL-1 – позитивные (зеленый цвет)



Б - Выраженный тип лимфоидной инфильтрации (зеленый цвет)



В - Умеренный тип лимфоидной инфильтрации (зеленый цвет)

Рисунок 6 – Инфильтрация опухоли лимфоидными клетками. Увеличение x 400

Выделяли три типа реакции:

1. практически полное отсутствие лимфоидной инфильтрации, слабая инфильтрация (антигенположительные клетки в срезе не определяются или определяется небольшое их количество в препарате, единичные клетки);

2. умеренная инфильтрация (умеренное количество антигенположительных клеток в срезе, расположенных разрозненно или отдельными группами);

3. выраженная инфильтрация (скопления антигенпозитивных клеток в срезе в виде очагов/зон, могут встречаться крупные группы и инфильтраты из этих клеток).

Моноклональные антитела, которые применялись для окрашивания срезов образцов опухолей женской репродуктивной системы представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Антитела для иммунофенотипирования лимфоцитов и опухолевых клеток

№	Антитело	Clone	Производитель
1	KL-1	-	Immunotech, Marseille, France
2	HLA-I	LN3	Becton Dickinson, США
3	HLA-DR	W6/32	Becton Dickinson, США
4	CD71	OX-26	Becton Dickinson, США
5	CD95	EOS9.1	Becton Dickinson, США
6	CD54	3E2	Becton Dickinson, США
7	MUC-1	HMPV	Becton Dickinson, США
8	CD29	HUTS-21	Becton Dickinson, США

9	Pgp170	0.N.505	Becton Dickinson, США
10	D11	-	Becton Dickinson, США
11	CD45	HI30	Becton Dickinson, США
12	CD38	HIТ2	Becton Dickinson, США
13	CD3	UCHT1	Becton Dickinson, США
14	CD4	4B12	Becton Dickinson, США
15	CD8	HIТ8a	Becton Dickinson, США
16	CD20	2H7	Becton Dickinson, США
17	F(ab2)-фрагменты, меченные FITC	M1-14D12	Becton Dickinson, США

Статистическая обработка

Для статистической обработки данных использовался пакет программ SPSS, версия 26. С применением теста Колмогорова-Смирнова проверялась гипотеза о принадлежности выборок к нормальным совокупностям. Для нормально распределенных величин достоверность различий между количественными показателями оценивали по критерию Стьюдента (при сравнении двух выборок) или путем дисперсионного анализа (при сравнении большего числа выборок). Также использована оценка с помощью непараметрических тестов: Манна-Уитни (две выборки) или Краскела-Уоллеса (больше двух выборок).

Сравнения качественных параметров выполняли по таблицам сопряженности признаков, применяли точный критерий Фишера или тест χ^2 по Пирсону. Для количественной оценки степени взаимосвязи параметров между двумя случайными величинами, в зависимости от их типа и нормальности распределения использовались коэффициенты корреляции по Пирсону или Спирмену. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Анализ выживаемости проводили по Каплан-Майеру. Для оценки достоверности различий в выживаемости пользовались тестами Лог-Ранк, Бреслоу, Тарон-Уоре. По результатам однофакторного анализа Кокса проводили многофакторный регрессионный анализ Кокса (методом пошагового исключения).

Результаты исследования

Взаимосвязь иммунофенотипа с клинико-морфологическими признаками опухолей

Первым этапом изучены иммунофенотипы опухолей и их взаимосвязи с клинико-морфологическими признаками. Экспрессия молекул HLA-DR достоверно отрицательно коррелировала с распространенностью рака молочной железы и рака шейки матки.

Увеличение стадии и размера первичной опухоли, метастазы в лимфатические узлы чаще сопровождалось HLA-DR негативным фенотипом (рака молочной железы, рака шейки матки). При I - IIВ - IIIС стадии рака молочной железы отсутствие экспрессии молекул HLA-DR установлено в 63,2% - 75,0% - 100,0%, соответственно, $p = 0,001$ (Таблица 8).

Таблица 8 – Взаимосвязь HLA-DR- антигена со стадией рака молочной железы

Стадия		Иммунофенотип опухоли		Итого
		HLA-DR «-»	HLA-DR «+»	
I	Абс.	12	7	19
	%	63,2%	36,8%	100,0%
IIА	Абс.	20	14	34
	%	58,8%	41,2%	100,0%
IIВ	Абс.	39	13	52
	%	75,0%	25,0%	100,0%
IIIА	Абс.	12	5	17
	%	70,6%	29,4%	100,0%
IIIВ	Абс.	19	0	19
	%	100,0%	0,0%	100,0%
IIIС	Абс.	8	0	8
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Итого	Абс.	110	39	149
	%	73,8%	26,2%	100,0%

Антиген HLA-DR при раке молочной железы экспрессировался в половине случаев исключительно при небольших размерах опухолевого узла (T1), а при нарастании размеров его экспрессия встречалась реже, $p = 0,002$, $\chi^2 = 12,646$ (Таблица 9).

Таблица 9 – Взаимосвязь HLA-DR- антигена с индексом Т при раке молочной железы

Индекс Т		HLA-DR «-»	HLA-DR «+»	Итого
T1	Абс.	18	13	31
	%	58,10%	41,90%	100,00%
T2	Абс.	70	25	95
	%	73,70%	26,30%	100,00%
T3	Абс.	4	1	5
	%	80,00%	20,00%	100,00%
T4	Абс.	19	0	19
	%	100,00%	0,00%	100,00%
Итого	Абс.	111	39	150
	%	74,00%	26,00%	100,00%

На рисунке 7 представлена взаимосвязь регионарного метастазирования с HLA-DR фенотипом опухолей при раке молочной железы.

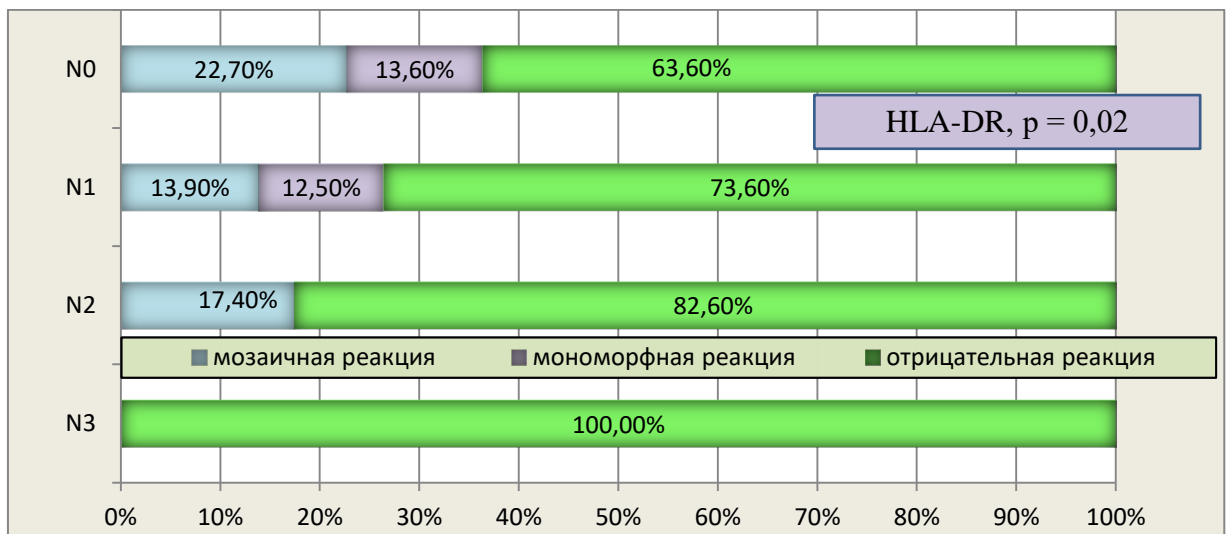


Рисунок 7 – Экспрессия молекул HLA-DR при раке молочной железы в зависимости от статуса лимфоузлов

При метастазах в регионарных лимфатических узлах HLA фенотип опухолей отличался высокой частотой отсутствия молекул гистосовместимости II класса. Следует обратить внимание, что мономорфной экспрессии при N2 статусе рака молочной железы не наблюдалось. Аналогичная картина имела место при раке шейки матки: процент антиген-негативных опухолей по HLA-DR составил 75% при наличии метастатически измененных лимфатических узлов (Рисунок 8).

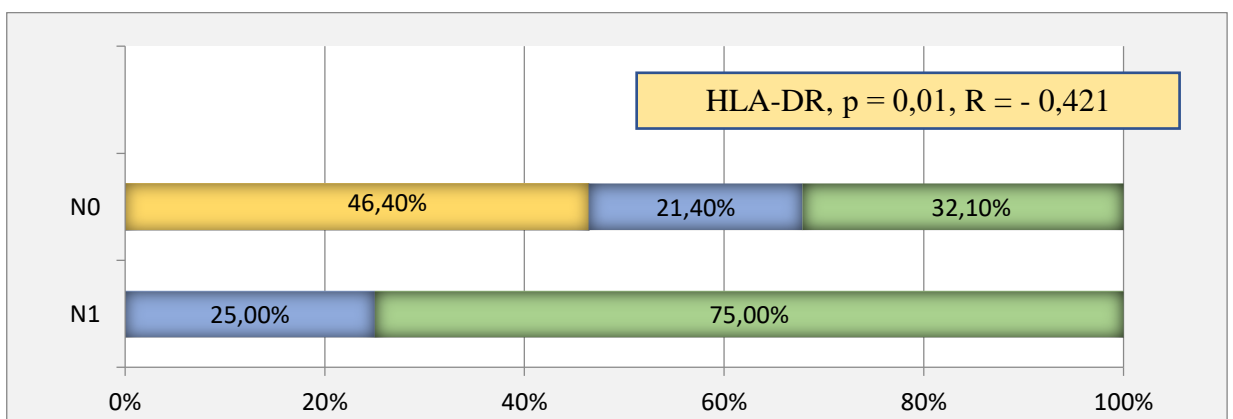
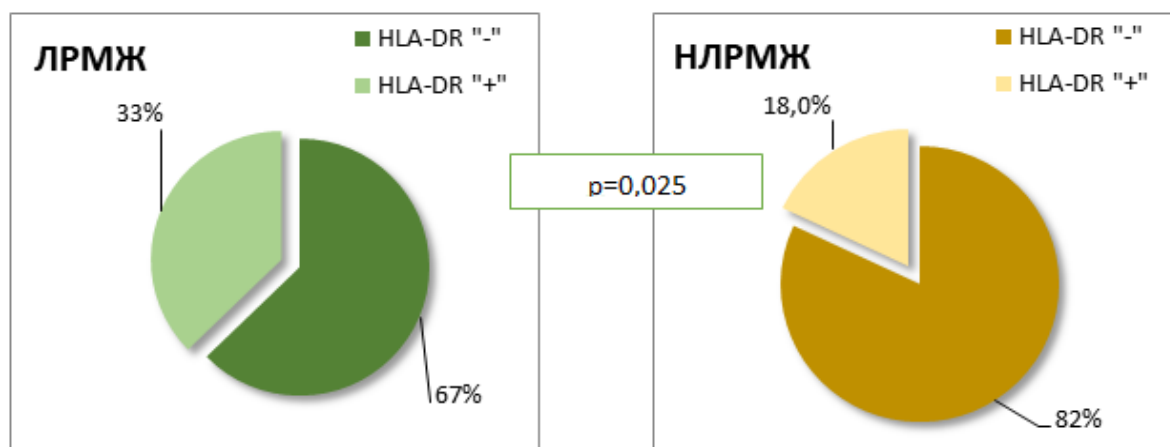


Рисунок 8 – Экспрессия молекул HLA-DR при раке шейки матки в зависимости от статуса лимфоузлов

При изучении иммунофенотипа опухоли в зависимости от суррогатного подтипа рака молочной железы (по РЭ) установлено, что при люминальном раке молочной железы молекулы HLA-DR экспрессированы чаще (Рисунок 9). По сравнению с нелюминальным раком молочной железы частота HLA-DR позитивных опухолей была практически вдвое больше.



ЛРМЖ – люминальный рак молочной железы, НЛРМЖ – нелюминальный рак молочной железы

Рисунок 9 – Частота экспрессии молекулы HLA-DR при люминальном и нелюминальном раке молочной железы

Выявлено, что высокодифференцированные опухоли (G1) рака шейки матки в основном демонстрировали HLA-DR мономорфный фенотип. Установлено, что экспрессия молекул β 1-интегринов CD29 достоверно связана с молекулярным подтипом рака молочной железы (по РЭ). Так, при нелюминальном подтипе рака молочной железы молекулы CD29 были экспрессированы достоверно чаще, чем при люминальном подтипе (Таблица 10).

Таблица 10 – Экспрессия CD29 при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы

Молекулярный подтип		Экспрессия CD29, вид реакции			Всего
		Отсутствует	Мозаичная	Мономорфная	
ЛРМЖ	Абс	3	3	5	11
	%	27,3%	27,3%	45,5%	100,0%
НЛРМЖ	Абс	0	9	11	20
	%	0,0%	45,0%	55,0%	100,0%
Всего	Абс	3	12	16	31
	%	9,7%	38,7%	51,6%	100,0%

p = 0,031

Установлено, что при раке молочной железы экспрессия FAS/APO лиганда CD95 и молекул адгезии CD54 взаимосвязаны. Экспрессия молекул CD95 была связана со стадией опухоли. Кроме того, имела место достоверная связь молекул FAS/APO лиганда CD95 с гистологическим видом рака молочной железы. При протоковом раке часто наблюдалось их отсутствие (Рисунок 10).

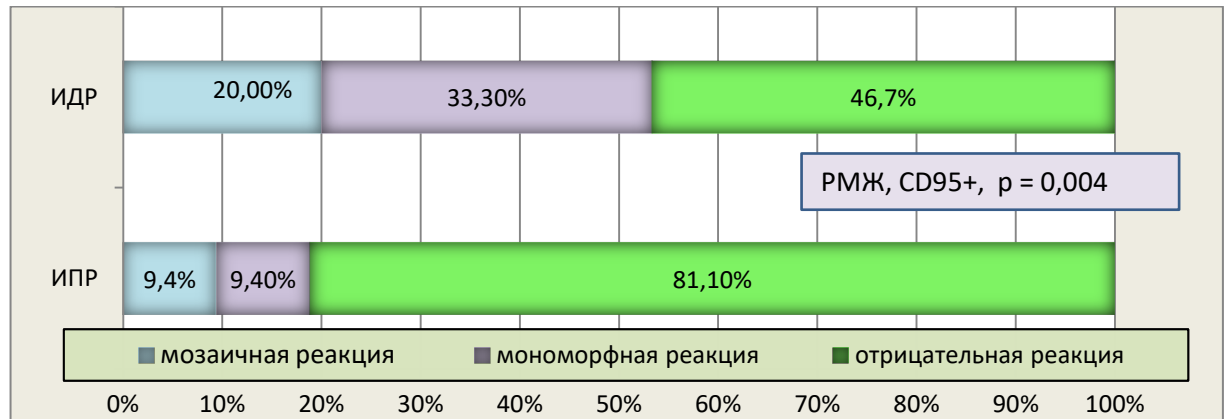


Рисунок 10 – Частота экспрессии молекул FAS/APO лиганда CD95 в зависимости от гистологического типа рака молочной железы

Интересным фактом стало обнаружение высокой частоты экспрессии трансферриновых рецепторов при люминальном раке молочной железы (по РЭ и РП) (Таблица 11). Как следует из таблицы, тип реакции был преимущественно мономорфный. По данным литературы, гиперэкспрессия трансферриновых рецепторов при люминальном раке ассоциируется с выраженной пролиферативной активностью опухоли, более низкой экспрессией рецепторов стероидных гормонов, экспрессией клетками рака Her/2neu, а также с плохим прогнозом.

Таблица 11 – Экспрессия трансферринового рецептора при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы

Молекулярный подтип		Экспрессия TfR1, вид реакции			Всего
		Отсутствует	Мозаичная	Мономорфная	
ЛРМЖ	Абс	23	10	63	96
	%	24,0%	10,4%	65,6%	
НЛРМЖ	Абс	18	11	23	52
	%	34,6%	21,2%	44,2%	
Всего	Абс	41	21	86	148
	%	27,7%	14,2%	58,1%	
p = 0,035					

Важно отметить, что часто TfR1 мономорфный фенотип был достоверно связан с мономорфной экспрессией молекул HLA I класса. Связь TfR1 и HLA-I фенотипов прослеживалась как при изучении рака молочной железы, так и рака тела матки, а также рака шейки матки. На рисунке 11 приводится пример мономорфной экспрессии трансферриновых рецепторов клетками рака шейки матки.

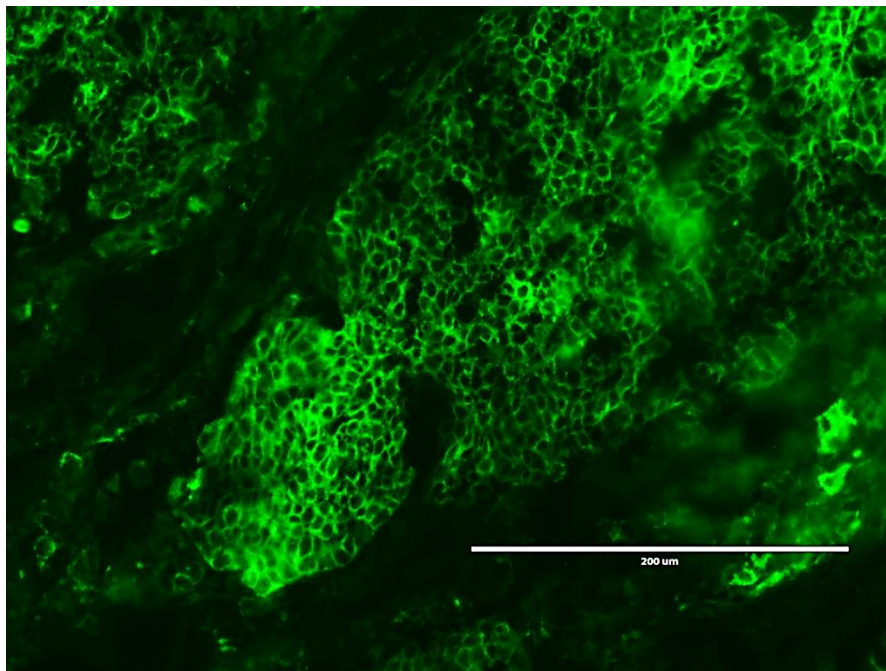


Рисунок 11 – Экспрессия трансферриновых рецепторов (TfR1) клетками рака шейки матки – зеленый цвет. Мономорфная реакция. Увеличение x 400

Картина частоты фенотипов при указанных опухолях примерно совпадала. Единственное следует отметить, что при раке молочной железы процент мономорфных реакций по обоим фенотипам TfR1 и HLA-I был несколько ниже (44,2%).

Иные данные при оценке взаимосвязи экспрессии опухоли трансферриновых рецепторов и молекул главного комплекса гистосовместимости нами получены при раке яичников. Установлено, что TfR1- мозаичный фенотип часто был ассоциирован с экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR). При этом фенотипе HLA-DR мозаичная реакция составила 73,7%, а мономорфная – 10,5%. TfR1- негативный фенотип при раке яичников в равном числе случаев сочетался с HLA-DR негативным и позитивным фенотипом опухоли (Таблица 12). Кроме того, мы обратили внимание, что при раке яичников имелась связь трансферринового фенотипа с экспрессией молекул β 1-интегринов CD29. При трансферрин позитивных опухолях доля мономорфно экспрессирующих CD29 клеток оказалась в два раза меньше (36,8%). Таким образом, как TfR1- позитивные, так и TfR1- негативные опухоли экспрессируют молекулы интегринов CD29.

Хотелось бы отметить, что при дальнейшем анализе мы установили связь фенотипа CD29 с общелейкоцитарной реакцией. При экспрессии молекул интегринов CD29 клетками рака молочной железы CD45+ инфильтрация при мономорфном и мозаичном фенотипе составила 31,3% и 67,1%, соответственно.

Таблица 12 – Экспрессия трансферринового рецептора клетками рака яичников и ее взаимосвязь с экспрессией молекул HLA-DR, молекул интегринов CD29

Экспрессия TfR1, вид реакции		Вид реакции			Итого
		Отрицательная	Мозаичная	Мономорфная	
		Экспрессия HLA-DR, p = 0,03			
Отрицательная	Абс.	7	4	3	14
	%	50,0%	28,6%	21,4%	100,0%
Мозаичная	Абс.	3	14	2	19
	%	15,8%	73,7%	10,5%	100,0%
		Экспрессия CD29, p = 0,001			
Отрицательная	Абс.	2	1	11	14
	%	14,3%	7,1%	78,6%	100,0%
Мозаичная	Абс.	0	12	7	19
	%	0,0%	63,2%	36,8%	100,0%

При анализе связи иммунофенотипа опухолей с выживаемостью мы обратили внимание, что интересные результаты были получены при анализе общей выживаемости в группе люминального подтипа рака молочной железы (на основании экспрессии РЭ). Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Показатели общей выживаемости больных раком молочной железы люминального подтипа в зависимости от HLA-DR иммунофенотипа опухоли

Фенотип опухоли	ОВ, М ± m			Кол-во больных	
	5-летняя	10-летняя	Средняя	n	%
HLA-DR"-"	80,6 ± 5,6 %	72,7 ± 6,9 %	181,5 ± 14,5 %	54	66,6
	Медиана – 204,00				
HLA-DR"+"	95,2 ± 4,6 %	95,2 ± 4,6 %	229,9 ± 7,9 %	27	34,4
	Медиана – не достигнута				
	χ^2			p	
Log Rank (Mantel-Cox)		5,167		0,023	
Breslow (Generalized Wilcoxon)		4,889		0,027	
Tarone-Ware		4,961		0,026	

Общая выживаемость больных раком молочной железы в случаях экспрессии опухолю молекул HLA-DR (HLA-DR- позитивная группа) превышала таковую при отсутствии этих молекул на клетках рака (HLA-DR- негативная группа). Это касалось 5- и 10- летней ОВ, различия достоверны. Кривые выживаемости по методу Каплана-Мейера представлены на рисунке 12.

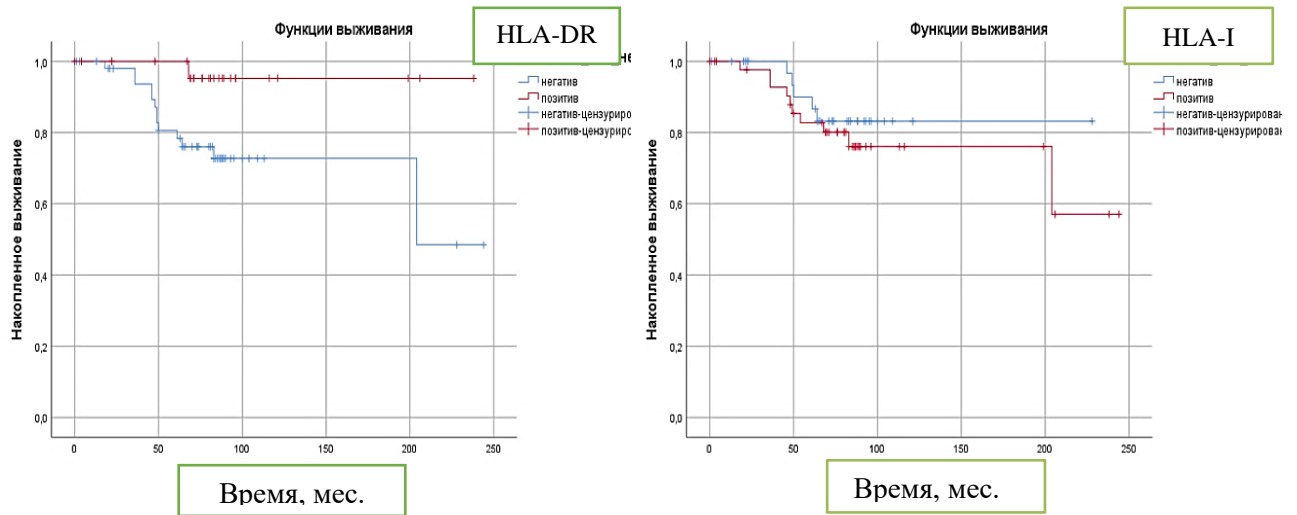


Рисунок 12 – Общая выживаемость больных раком молочной железы с люминальным подтипом в зависимости от HLA-иммунофенотипа

Экспрессию трансферриновых рецепторов при раке связывают с прогрессированием опухоли, и это показано в работе Е.В. Артамоновой при ранних стадиях рака молочной железы. В нашем исследовании ухудшение показателей выживаемости при экспрессии опухолю трансферриновых рецепторов мы отметили при раке молочной железы и при раке яичников. Выживаемость больных раком молочной железы в случаях отсутствия экспрессии опухолю трансферриновых рецепторов (TfR1- негативная группа) превышала таковую при их экспрессии клетками рака (TfR1- позитивная группа). Этот факт требует дальнейших исследований и обсуждений.

Взаимосвязь интрагуморальных иммунных реакций с клинико-морфологическими параметрами опухолей

При изучении интрагуморальных иммунных реакций опухолей женской репродуктивной системы мы выявили ряд очень важных закономерностей, подтверждающих значимую роль эффекторных звеньев иммунопоза в развитии опухолей, неразрывную их связь с иммунофенотипическими характеристиками. Установлено, что Т-клеточные реакции являлись

ведущими, причем их выраженность была ассоциирована с ранними стадиями рака. Это четко наблюдалось при раке молочной железы (уровень CD45+, CD8+ инфильтрации достоверно отрицательно коррелировал с величиной первичной опухоли), а также при раке яичников.

Выявлено, что интратуморальные иммунные реакции качественно различались в строме и в паренхиме опухолей (Рисунок 13).

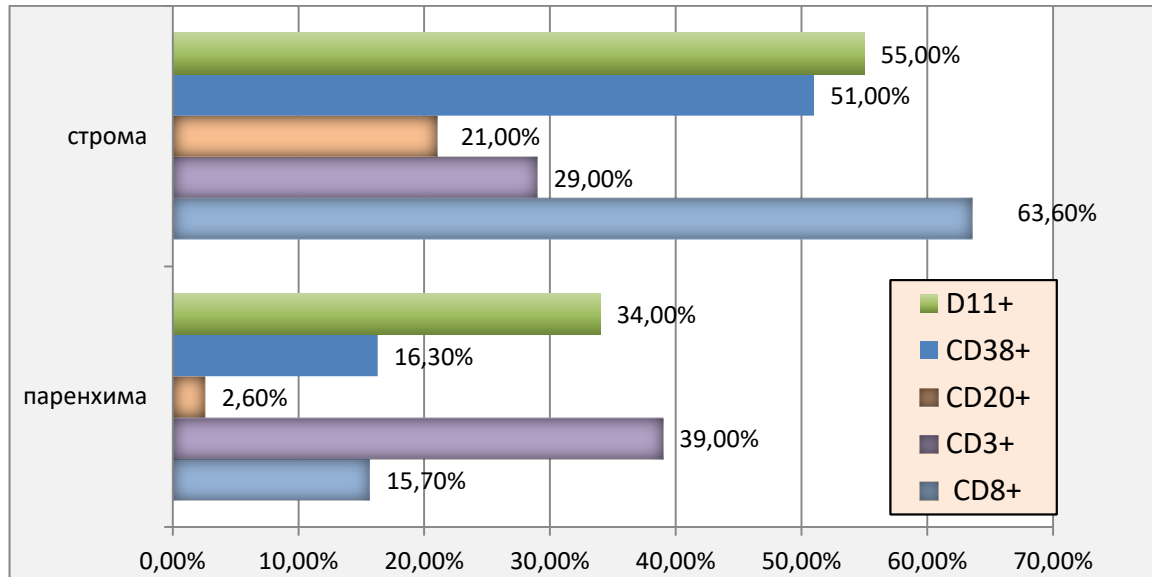


Рисунок 13 – Интратуморальные иммунные реакции при раке шейки матки

Ранние стадии рака яичников сопровождались высокой частотой как Т-клеточных, так и НК-клеточных реакций в паренхиме, но слабой инфильтрацией CD8+ клетками. Тогда как при раке шейки матки имел место выраженный уровень CD20+ В-клеточных реакций в строме, который коррелировал с более распространенной клинической стадией ($p = 0,04$). Интратуморальные иммунные реакции в строме при раке тела матки чаще наблюдались при нарастании стадии опухоли ($p = 0,04$), при регионарном метастазировании ($p = 0,03$), что происходило за счет увеличения доли В-клеточных реакций. Схожие данные получены и в отношении плазмоцитарных реакций.

Факт слабой инфильтрации CD8+ клетками, при выраженном характере НК-клеточных интратуморальных реакций при выявленной нами делеции молекул главного комплекса гистосовместимости вполне логичен и это согласуется с канонами классической иммунологии. В соответствии с ними Т-клетки распознают антигены в контексте молекул HLA, тогда как натуральные киллеры нацеливаются на клетки с нарушенной HLA экспрессией.

Нами выявлено, что метастазирование в регионарные лимфатические узлы (N+) сопровождалось снижением уровня интратуморальных иммунных реакций первичной опухоли по Т-клеточному звену и нарастанию выраженности В-клеточных реакций. Так, при раке

молочной железы частота обнаружения метастазов в регионарных лимфатических узлах увеличивалась со снижением выраженности местных интратуморальных реакций. Общий уровень CD45+ инфильтрации был ниже при наличии регионарного метастазирования по сравнению с его отсутствием, составив 61,9% (n = 26) при N0, 37,5% (n = 27) при N1, 22,2% (n = 2) при N3. Уровень CD38+ плазмодитарных интратуморальных реакций нарастал при увеличении индекса N (Рисунок 14).

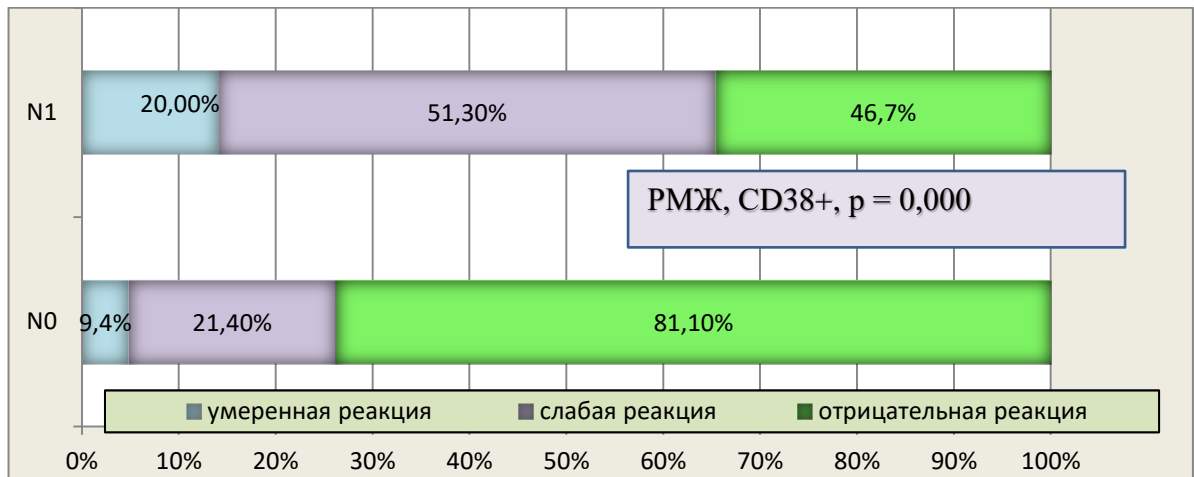


Рисунок 14 – Интратуморальные CD38+ реакции при раке молочной железы в зависимости от статуса N

Дополнительно, характер интратуморальных иммунных реакций был взаимосвязан с иммунофенотипом опухолей женской репродуктивной системы. Обратим внимание, это закономерность была правомочна для экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса, трансферриновых рецепторов, молекул адгезии.

Так, при раке молочной железы TfR1- позитивные опухоли демонстрировали более выраженные CD3+ Т-клеточные реакции: доля умеренных составила 6,9%, выраженных – 37,5%, тогда как при TfR1-негативных опухолях чаще встречались интратуморальные реакции умеренного и слабого характера (30,8% и 42,3%).

Установлена связь интратуморальных реакций с суррогатным подтипом рака молочной железы, а именно, при нелюминальном подтипе выраженная CD45+ реакция наблюдалась чаще, чем при люминальном подтипе (48,5% против 25,3%, p = 0,010) (Таблица 14). Аналогичные данные получены в отношении CD3+ Т-клеточных реакций, p = 0,026. Также при нелюминальном подтипе чаще, чем при люминальном, наблюдались В-клеточные интратуморальные реакции, что составило 41,2% и 10,6%, соответственно.

Таблица 14 – Уровень интратуморальных иммунных реакций при люминальном и нелюминальном подтипе рака молочной железы (по РЭ)

CD45, $p = 0,010$, $\chi^2 = 9,107$					
Подтип		Слабая	Умеренная	Выраженная	Всего
ЛРМЖ	n	34	28	21	83
	%	41,00%	33,70%	25,30%	100,00%
НЛРМЖ	n	17	18	33	68
	%	25,00%	26,50%	48,50%	100,00%
CD3, $p = 0,026$, $\chi^2 = 7,100$					
ЛРМЖ	n	38	12	17	67
	%	56,70%	17,90%	25,40%	100,00%
НЛРМЖ	n	15	2	17	34
	%	44,10%	5,90%	50,00%	100,00%
CD20, $p = 0,001$, $\chi^2 = 12,641$					
ЛРМЖ	n	59	7	-	66
	%	89,40%	10,60%	-	100,00%
НЛРМЖ	n	20	14	-	34
	%	58,80%	41,20%	-	100,00%

Нелюминальный подтип рака молочной железы характеризовался также более выраженным уровнем плазмочитарных CD38+ реакций, который составил 85%, что почти в три раза больше, чем при люминальном подтипе (Рисунок 15).

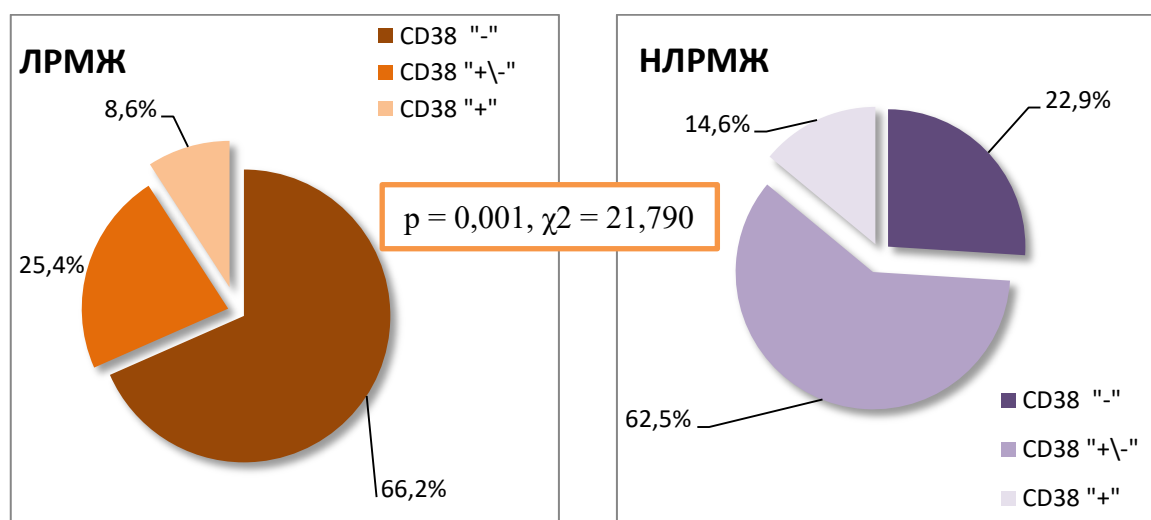
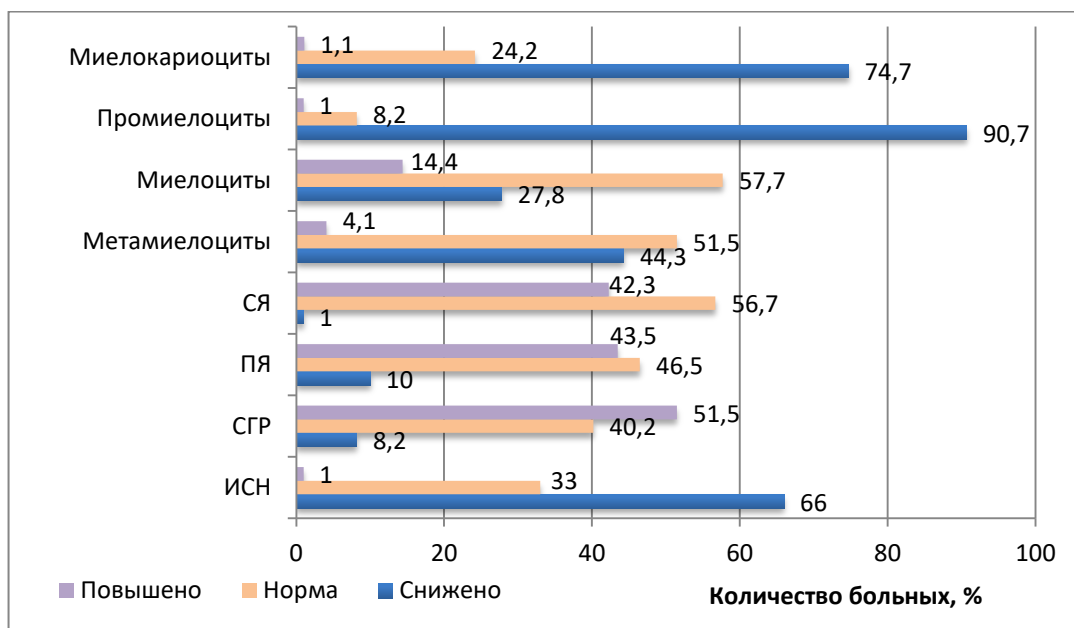


Рисунок 15 – Инфильтрация опухоли CD38+ клетками при люминальном (ЛРМЖ) и нелюминальном (НЛРМЖ) подтипах рака молочной железы (по РЭ)

По литературным данным, высокие уровни инфильтрации опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами (CD8+) являются важным фактором благоприятного прогноза, в особенности, у пациенток, не имеющих метастазов в регионарные лимфатические узлы (N0). Оценка интратуморальных иммунных реакций при раке молочной железы в нашей работе показала, что CD45+ интратуморальные реакции в целом не имели ассоциации с показателями выживаемости, также как и Т-клеточные реакции. Важным наблюдением, на наш взгляд, стала ассоциация В-клеточных и плазмоцитарных интратуморальных реакций с показателями выживаемости больных раком молочной железы с люминальным подтипом: слабый тип как CD20+, так и CD38+ клеточных реакций наблюдался при более высокой выживаемости. Эти данные отражают наши результаты, полученные при анализе связей интратуморальных реакций с клинико-морфологическими параметрами опухоли, в частности со стадией.

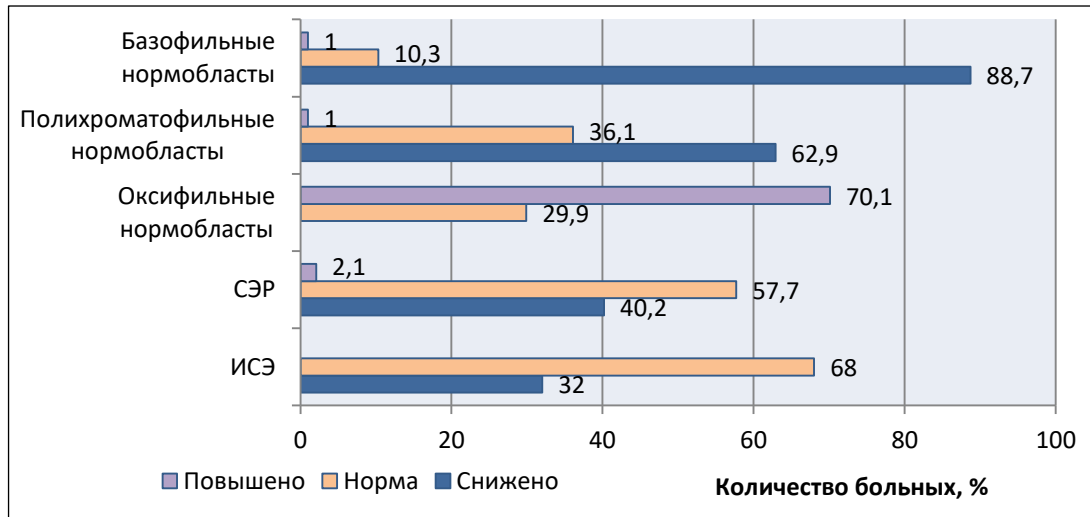
Результаты изучения костного мозга

На следующем этапе работы изучены показатели гемопоэза при опухолях женской репродуктивной системы. Выявлены изменения клеточного состава костного мозга по сравнению с нормой. Эти изменения касались как гранулоцитарного, так и эритроидного ростка костного мозга, и общая тенденция отмечена при всех видах опухолей. Имело место снижение уровня миелоидных предшественников, нарастание терминальных форм эритробластической дифференцировки (Рисунки 16, 17).



СЯ – сегментоядерные нейтрофилы, ПЯ – палочкоядерные нейтрофилы, СГР – сумма клеток гранулоцитарного ростка, ИСН – индекс созревания нейтрофилов

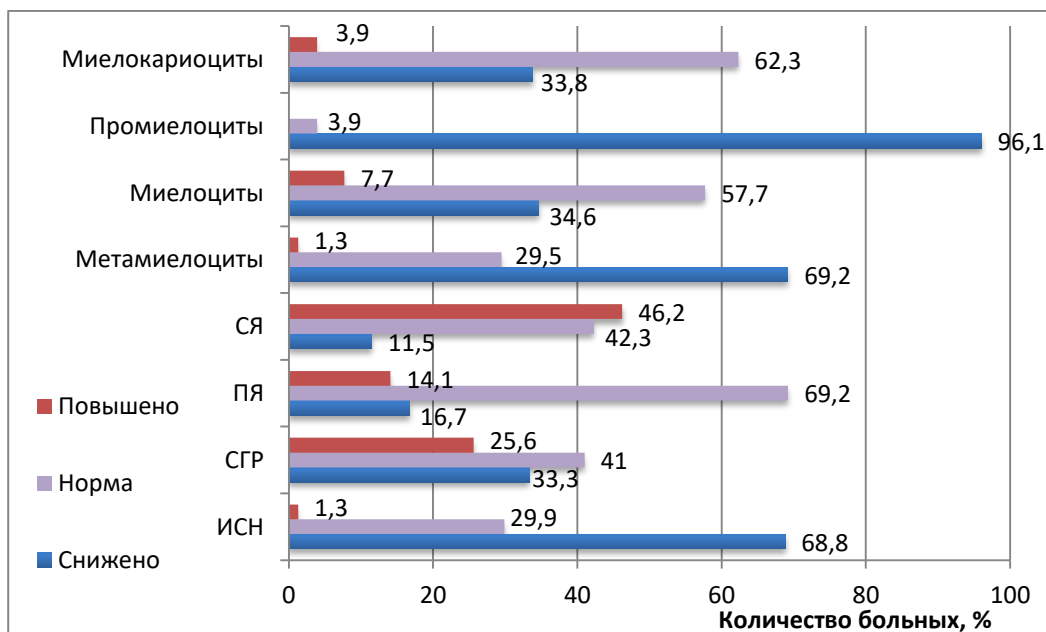
Рисунок 16 – Показатели гранулоцитарного ростка при раке молочной железы



СЭР – сумма клеток эритроидного роста, ИСЭ – индекс созревания эритроцитов

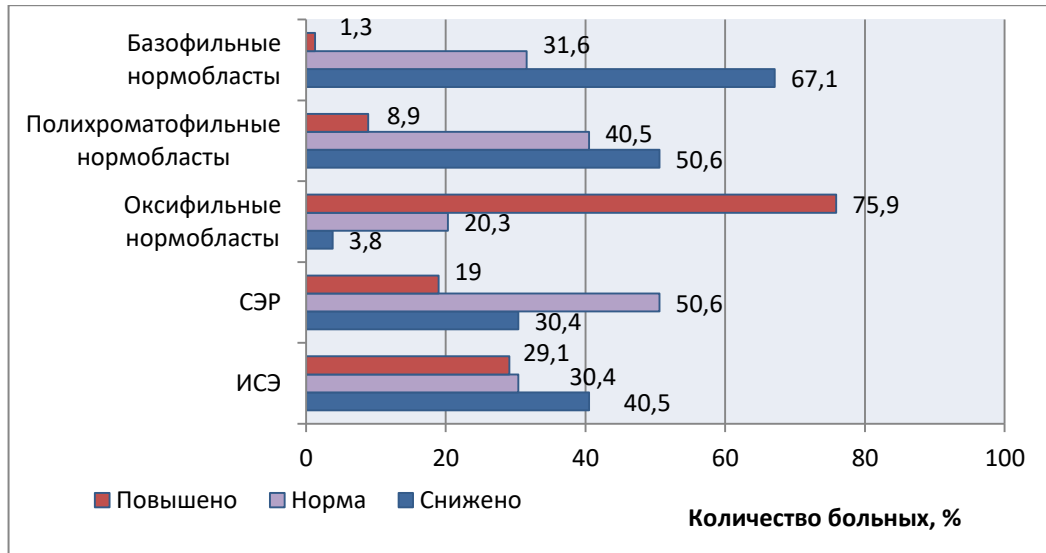
Рисунок 17 – Показатели эритроидного роста при раке молочной железы

В большинстве случаев количество промиелоцитов оказалось сниженным. Также обращало на себя внимание уменьшение доли юных форм – метамиелоцитов, что особенно выраженным выглядело при раке яичников. Изменения уровня миелоидных предшественников и терминальных форм эритробластической дифференцировки при раке яичников представлены на рисунках 18, 19. При детальном анализе показателей эритроидного роста установлено превышение содержания оксифильных нормобластов в сравнении с нормой практически в три раза, и это отмечено в большинстве образцов костного мозга.



СЯ – сегментоядерные нейтрофилы, ПЯ – палочкоядерные нейтрофилы, СГР – сумма клеток гранулоцитарного роста, ИСН – индекс созревания нейтрофилов

Рисунок 18 – Показатели гранулоцитарного роста при раке яичников



СЭР – сумма клеток эритроидного роста, ИСЭ – индекс созревания эритроцитов

Рисунок 19 – Показатели эритроидного роста при раке яичников

Установлена связь показателей гемопоэза с распространенностью опухолевого процесса. При увеличении стадии снижалась клеточность костного мозга, а также уменьшалось число молодых форм миелоидного роста (миелоцитов, метамиелоцитов). Так, при раке молочной железы в ходе анализа установлено, что повышенные уровни миелоцитов при T1 стадии наблюдались значительно чаще (23,4%), чем при размерах опухоли, соответствующим T2 (6,1%) (Таблица 15). Среднее содержание миелоцитов составило $10,0 \pm 0,4\%$ при T1 стадии против $7,8 \pm 0,4\%$ при T2, $p = 0,001$. Это отражалось на индексе созревания нейтрофилов, который составил $0,43 \pm 0,02\%$ против $0,35 \pm 0,02\%$, $p = 0,01$.

Таблица 15 – Взаимосвязь миелоцитов с размером опухоли (индекс T) при раке молочной железы

T индекс		Миелоциты			Всего
		Снижены	Норма	Повышены	
T1	n	8	28	11	47
	%	17,00%	59,60%	23,40%	100,00%
T2-3	n	19	28	3	49
	%	37,70%	57,10%	6,10%	100,00%
Всего	n	27	56	14	97
	%	27,80%	57,70%	14,40%	100,00%
$p = 0,02, \chi^2 = 10,958$					

Высокодифференцированные опухоли чаще характеризовались более высокими клеточностью костного мозга и содержанием клеток гранулоцитарного ростка. При раке яичников содержание метамиелоцитов оказалось выше при high grade аденокарциноме в сравнении с low grade, 7,0% против 5,1%. Кроме того, сумма клеток гранулоцитарного ростка при high grade аденокарциноме была больше, 62,6% против 54,7% ($p = 0,035$). При раке молочной железы содержание миелокариоцитов было выше при 1 степени злокачественности (156,8 тыс\мкл) в сравнении со 2 степенью (75,3 тыс\мкл, $p = 0,003$) и 3 степенью (71,5 тыс\мкл, $p = 0,03$).

Результаты морфологического исследования костного мозга у больных могли бы свидетельствовать об угнетении гранулоцитарного ростка костного мозга, что, возможно, происходит вследствие продукции опухолью биологически активных факторов, которые могут опосредованно подавлять выработку гранулоцитарно-макрофагального колонестимулирующего фактора клетками микроокружения костного мозга. Выявленное нарастание терминальных форм эритробластической дифференцировки у больных опухолями женской репродуктивной системы, может являться компенсаторным механизмом, препятствующим развитию анемии у больных с солидными опухолями.

Установлено, что миелоидные предшественники находились в отрицательной корреляции средней силы с Т- эффекторными клетками костного мозга, зрелые нейтрофилы – в положительной корреляции. Плазматические клетки, эритроидные предшественники достоверно отрицательно коррелировали с НК- клетками костного мозга.

Детальный анализ популяций костного мозга выявил увеличение пропорции Т-, В-клеток как при раке молочной железы, так и при раке яичников. В большинстве образцов содержание CD3+ клеток составляло более 60% костномозговой нормы, а уровни цитотоксических CD8+ клеток превышали 30%. При этом имел место сниженный уровень активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, менее 10%. Содержание CD19+ В-клеток оказалось выше 10%.

Установлена связь лимфоцитарных популяций костного мозга со стадией опухоли, ее размером, регионарным метастазированием, степенью ее дифференцировки. На рисунке 20 представлена связь популяций лимфоцитов костного мозга со стадией рака молочной железы. В отношении CD19+CD5+, CD19+CD10+ В-клеток отмечено, что их уровень при II стадии был выше практически в два раза. При сравнении I и III стадий установлено, достоверное преобладание зрелых Т-клеток (за счет доли CD4+) при третьей стадии. При отсутствии метастатического поражения лимфатических узлов (статусе N0) процентное содержание CD4+ Т-клеток составило $34,7\% \pm 1,8$ ($n = 35$), тогда как при метастазах в лимфатические узлы (N+) – $42,0\% \pm 1,9$ ($n = 29$), признаки достоверно связаны, $p = 0,008$.

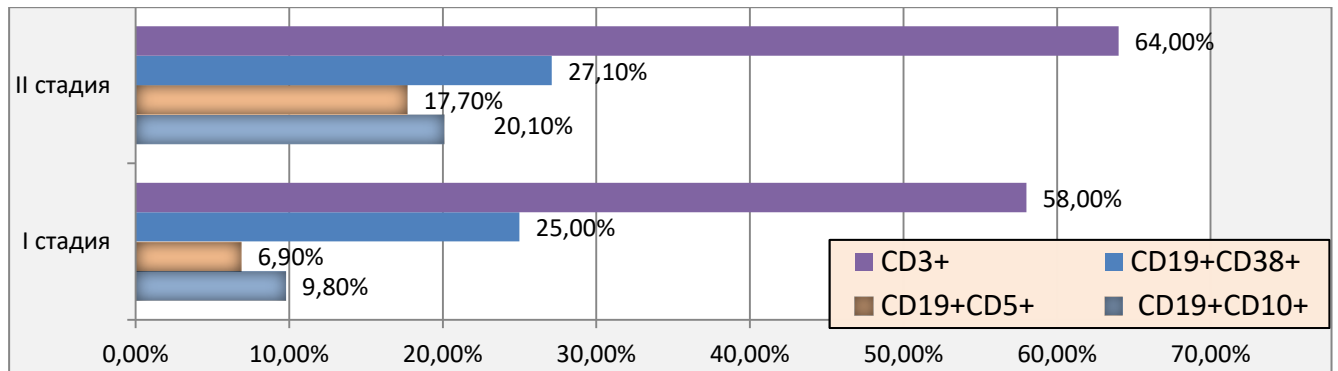


Рисунок 20 – Связь лимфоцитарных популяций костного мозга со стадией опухоли

Увеличенная доля В-клеток (врожденного иммунитета CD19+CD5+, В-предшественников CD19+CD10+) в костном мозге довольно любопытный факт. Известно, что именно костномозговые В1-клетки продуцируют значительно большее количество антител класса М, которые реализуют программу апоптоза опухолевых клеток. В этом контексте весьма интересны результаты, полученные при анализе субпопуляций В лимфоцитов костного мозга в зависимости от экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона (Таблица 16).

Таблица 16 – Популяции В-лимфоцитов костного мозга в зависимости подтипа рака молочной железы

Популяции лимфоцитов	Подтип	n	M, %	Станд. отклонение	m	p
CD19+	ЛРМЖ	37	17,9030	10,99723	1,80793	> 0,05
	НЛРМЖ	21	14,7890	8,26157	1,80282	
CD19+CD10+	ЛРМЖ	33	19,4676	18,79937	3,27255	> 0,05
	НЛРМЖ	18	13,1183	10,79577	2,54459	
CD19+CD38+	ЛРМЖ	39	26,2467	13,79835	2,20950	> 0,05
	НЛРМЖ	21	26,6386	18,11007	3,95194	
CD19+CD5+	ЛРМЖ	35	10,8203	9,06518	1,53230	0,03
	НЛРМЖ	18	21,0894	25,80136	6,08144	

Мы наблюдали, что при люминальном раке молочной железы содержание CD19+CD10+ В-лимфоцитов повышено (19,4% и 13,1%, $p = 0,19$), тогда как доля В1- клеток была меньше (10,8% и 21,08%), $p = 0,038$. Дополнительно отметим корреляции по Спирмену средней силы для НК- клеток (CD3-CD16+, CD3-CD56+) $R = -0,330$, $p = 0,033$, и для CD19+CD10+ клеток, $R = -0,364$, $p = 0,009$ с подтипом рака молочной железы (по РЭ) (Таблица 16). Таким образом, по результатам данного анализа, при раке молочной железы имеется связь экспрессионного подтипа опухоли (по РЭ, а также РП) с В- клеточным звеном иммунопоэза, которая касается прежде всего клеток врожденного иммунитета и В-предшественников.

Абсолютно новым фактом стали результаты, полученные при сопоставлении иммунных реакций костного мозга и интратуморальных иммунных реакций (Таблица 17). При раке молочной железы костномозговые лимфоидные популяции находились в отрицательной корреляции с иммунными клетками, инфильтрирующими опухоль.

Плазмоциты CD38+ коррелировали с уровнем НК-клеток костного мозга; CD3+, CD8+, CD4+ Т клетки были связаны с уровнем В-предшественников (CD19+CD10+). Отрицательная корреляция плазмоцитов CD38+ отмечена с уровнем В1-лимфоцитов (CD19+CD5+). Это не исключает регуляторного влияния соответствующих клеток с цитотоксическим потенциалом, а также клеток врожденного иммунитета костного мозга на интратуморальные иммунные реакции.

Таблица 17 – Корреляционные связи костномозговых лимфоцитов с интратуморальными иммунными реакциями

Популяции лимфоцитов костного мозга		Опухоль инфильтрирующие популяции лимфоцитов					
		CD45+	CD3+	CD4+	CD8+	CD20+	CD38+
CD16+CD3-, CD56+CD3-	R	0,216	0	0,045	-0,107	-0,344	-,455*
	p	0,347	1	0,832	0,636	0,149	0,044
	n	21	21	25	22	19	20
CD3+	R	-0,127	-0,067	-0,113	-0,228	0,203	-0,116
	p	0,497	0,722	0,525	0,209	0,29	0,543
	n	31	31	34	32	29	30
CD45RO+	R	0,142	-0,199	0,02	0,072	0,265	0,156
	p	0,432	0,268	0,907	0,688	0,149	0,393
	n	33	33	35	34	31	32
CD4+	R	0,026	0,015	-0,003	-0,026	0,029	-0,14
	p	0,882	0,931	0,987	0,88	0,874	0,436
	n	34	34	36	35	32	33
CD8+	R	-0,079	-0,02	-0,019	0,021	0,245	0,178
	p	0,662	0,914	0,91	0,906	0,184	0,33
	n	33	33	36	35	31	32
CD4+/CD8+	R	0,054	-0,036	0,012	-0,006	-0,184	-0,156
	p	0,766	0,843	0,947	0,972	0,322	0,393
	n	33	33	35	34	31	32
CD8+HLADR+	R	-0,111	0,047	0,071	0,076	-0,012	0,077
	p	0,561	0,805	0,69	0,678	0,952	0,69
	n	30	30	34	32	28	29

CD4+CD25+	R	0,136	0,161	0,159	-0,01	0,252	-0,006
	p	0,481	0,403	0,377	0,959	0,205	0,977
	n	29	29	33	31	27	28
CD19+	R	0,167	0,175	0,154	0,098	-0,013	-0,124
	p	0,395	0,372	0,407	0,613	0,948	0,538
	n	28	28	31	29	26	27
CD19+CD10+	R	-0,153	-0,323	-,420*	-0,34	0,28	-0,089
	p	0,437	0,094	0,021	0,077	0,166	0,659
	n	28	28	30	28	26	27
CD19+CD38+	R	0,046	0,204	0,218	0,177	0,248	-0,033
	p	0,804	0,272	0,209	0,323	0,194	0,863
	n	31	31	35	33	29	30
CD19+CD5+	R	-0,271	-0,178	-0,217	-,520*	-0,062	0,023
	p	0,309	0,51	0,438	0,047	0,827	0,935
	n	16	16	15	15	15	15

По результатам исследования костного мозга при раке яичников мы считаем целесообразным сделать акцент на минорных популяциях лимфоцитов, таких как перфорин/гранзим содержащие. Мы считаем, что в их отношении получены весьма интересные результаты, которые хорошо подчеркивают взаимосвязь пропорции эффекторных клеток костного мозга и распространенности опухоли. Это касалось, по крайней мере, двух лимфоидных популяций: Perforin+CD3+ и Perforin+CD27+ клеток. Наравне с этим имело место увеличение пропорции CD3-Granzim+ -клеток, равно как и пропорции Granzim+CD4+ - лимфоцитов. Такое совпадение по нескольким типам эффекторных популяций, на наш взгляд, может свидетельствовать о повышении уровня цитотоксических реакций при раке яичников распространенных стадий.

Таким образом, комплексное многопараметровое изучение эффекторных звеньев иммунопоза опухолей женской репродуктивной системы, выполненное впервые, позволило не только установить взаимосвязи интратуморальных иммунных реакций с антигенным ландшафтом опухолей женской репродуктивной системы, но и обнаружило весьма важные корреляции между иммунными реакциями в первичном очаге и костном мозге, и, наравне с этим, выявило существенные изменения гемопоэза, что может задать вектор дальнейшим исследованиям.

ВЫВОДЫ

1. Иммунофенотипический HLA-DR портрет опухоли связан с клинико-морфологическими характеристиками опухолей женской репродуктивной системы: стадией, размером первичной опухоли, наличием регионарных метастазов. Экспрессия молекул HLA-DR характеризует группу благоприятного прогноза при люминальном подтипе рака молочной железы.

2. Tfr1 (CD71) - иммунофенотип связан с экспрессией молекул HLA-I класса при раке молочной железы, раке тела матки, а также раке шейки матки. Мономорфный Tfr1-иммунофенотип наблюдается чаще при люминальном подтипе рака молочной железы. При раке яичников Tfr1- мозаичный фенотип часто ассоциирован с экспрессией HLA-DR.

3. Экспрессия FAS/APO лиганда CD95 и молекул адгезии CD54 взаимосвязаны, имеют связь со стадией (FAS/APO лиганд), размером первичной опухоли при раке молочной железы. CD95 негативный фенотип выявляется чаще при протоковом раке молочной железы, коррелирует с высокой частотой регионарного метастазирования.

4. Интратуморальные иммунные реакции опухолей женской репродуктивной системы качественно различаются в строме и паренхиме опухоли. Т-клеточные иммунные реакции опухолей женской репродуктивной преимущественно характерны для ранних стадий, В-клеточные и плазмочитарные – для поздних стадий. Рак яичников ранних стадий характеризуется высокой частотой Т-клеточных и НК-клеточных интратуморальных реакций. При раке шейки матки В-клеточные реакции стромы прямо коррелируют со стадией.

5. При раке молочной железы, раке тела матки, раке шейки матки выраженные интратуморальные CD8+ Т-клеточные, CD38+плазмочитарные реакции преобладают при HLA-DR мономорфном фенотипе. При раке тела и шейки матки Tfr1- мономорфный фенотип сопровождается выраженными цитотоксическими CD8+, В-клеточными реакциями в строме. Выраженный характер Т-клеточных реакций связан с позитивным CD29 и CD54 фенотипом рака молочной железы.

6. Показатели гемопоэза связаны с клинико-морфологическими параметрами опухолей женской репродуктивной системы: с нарастанием стадии снижается доля миелоидных предшественников, увеличивается содержание терминальных форм эритробластической дифференцировки. Миелоидные предшественники находятся в отрицательной корреляции с костномозговыми CD4+CD25+, CD8+HLA-DR+ популяциями Т-клеток при раке молочной железы, CD3+CD4+, CD4+Granzim+, CD45+Granzim+/Perforin+ лимфоидными популяциями при раке яичников. Эритроидные предшественники находятся в отрицательной связи с НК-клетками костного мозга при раке молочной железы.

7. В костном мозге пропорция В-клеток врожденного иммунитета (CD19+CD5+) и В-предшественников (CD19+CD10+) увеличивались при нарастании стадии опухолей женской репродуктивной системы.

8. Эффекторные популяции лимфоцитов костного мозга находятся в отрицательной корреляции с интратуморальными иммунными реакциями: содержание В-предшественников (CD19+CD10+) и В1-клеток врожденного иммунитета (CD19+CD5+) взаимосвязано с уровнями субпопуляций Т-клеток (CD4+, CD8+) в опухолевой ткани при раке молочной железы.

Практические рекомендации

1. Иммунофенотипический портрет опухоли на основании экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) целесообразно определять при раке молочной железы люминального подтипа с целью дифференцированного выбора лекарственной терапии. Выбор тактики лечения должен определяться на мультидисциплинарном консилиуме, включающего иммунолога, с учетом индивидуального иммунного профиля опухоли.

2. Иммуногистохимическое исследование характера местных иммунных реакций необходимо проводить отдельно в стромальном и в паренхиматозном компоненте опухоли. Следует также учитывать, что Т-клеточные иммунные реакции опухолей женской репродуктивной преимущественно характерны для ранних стадий, В-клеточные и плазмочитарные – для поздних стадий.

3. Изменение показателей гемопоэза у больных опухолями женской репродуктивной системы необходимо рассматривать с позиций возможной поддерживающей терапии и коррекции этих нарушений. При анализе лимфопоэза следует помнить, что в костном мозге пропорция В-клеток врожденного иммунитета (CD19+CD5+) и В-предшественников (CD19+CD10+) увеличивались при нарастании стадии опухолей женской репродуктивной системы. Это позволит выбрать оптимальный вид иммунокорректирующей терапии.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Изучение эффекторных звеньев иммунопоэза у больных опухолями женской репродуктивной системы требует дальнейшего изучения. Полученные в работе данные о взаимосвязи интратуморальных иммунных реакций с иммунофенотипом опухолей, об иммуноморфологических особенностях костного мозга расширяют представление о биологии рака и позволяют определить дальнейшие перспективы разработки данной тематики:

- изучение иммунологических параметров, ассоциированных с выраженностью иммунных реакций опухолей женской репродуктивной системы в разных прогностических группах, с учетом клинико-морфологических особенностей по каждой нозологии;
- разработка персонифицированных подходов в лечении опухолей женской репродуктивной системы с включением иммунотерапевтического воздействия на основе иммунологического профиля опухолей;
- совершенствование лечебных подходов, направленных на нормализацию и поддержание иммунологической реактивности организма больного.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Чулкова, С.В.** Характеристика гранулоцитарного ростка костного мозга у больных раком яичников: взаимосвязь с клинико- морфологическими характеристиками. / С.В. Чулкова, А.М. Кожоналиева, И.С. Стилиди, А.Д. Палладина, И.В. Поддубная, О.П. Колбацкая, К.И. Жордания, Н.А. Купрышина, И.И. Бокин, Е.В. Артамонова, Н.Н. Тупицын // Онкогинекология. — 2020. — Т. 36. — №. 4. — С. 26-36 (Журнал ВАК).
2. **Чулкова, С.В.** Сравнительная оценка показателей миелограммы при первичном и рецидивном раке яичников. / С.В. Чулкова, А.М. Кожоналиева, И.С. Стилиди, И.В. Поддубная, А.Д. Палладина, О.П. Колбацкая, К.И. Жордания, Н.А. Купрышина, И.И. Бокин, Е.В. Артамонова, Е.В. Егорова, Н.В. Лепкова, Н.Н. Тупицын // Медицинский алфавит. — 2021. — №. 1. — С. 39-46 (Журнал ВАК).
3. Рябчиков, Д.А. Субпопуляции интратуморальных эффекторных клеток при раке молочной железы (обзор литературы и представление собственных данных). / Д.А. Рябчиков, **С.В. Чулкова**, Ф.А. Шамилов, Н.В. Чантурия, С.Д. Желтиков // Креативная хирургия и онкология. — Т.11.— 2021.— №4.— С.328-336 (Журнал ВАК).
4. **Чулкова, С.В.** Характеристика эритроидного ростка костного мозга у больных раком яичников. / С.В. Чулкова, А.М. Кожоналиева, И.С. Стилиди, И.В. Поддубная, А.Д. Палладина, О.П. Колбацкая, К.И. Жордания, Н.А. Купрышина, И.И. Бокин, Е.В. Артамонова, Н.Н. Тупицын // Онкогинекология. — 2021. — Т. 37. — №. 1. — С. 26-37 (Журнал ВАК).
5. Рябчиков, Д.А. Результаты изучения иммунофенотипа рака молочной железы и его взаимосвязь с показателями гемопоэза. / Д.А. Рябчиков, **С.В. Чулкова**, Ф.А. Шамилов, Н.В. Чантурия, С.Д. Желтиков, Н.Н. Тупицын // Современная онкология. — 2021. — Т.23. — №. 2. — С. 275-279 (Журнал ВАК, SCOPUS).
6. **Чулкова, С.В.** HLA-мономорфные детерминанты первичной опухоли у больных раком молочной железы. / С.В. Чулкова, Е.Н. Шолохова, И.В. Поддубная, И.С. Стилиди, Н.Н.

Тупицын // Российский биотерапевтический журнал. — 2022. — Т. 21. — №. 2. — С. 56-66 (Журнал ВАК).

7. **Чулкова, С.В.** Анализ взаимосвязи трансферринового рецептора 1 (TfR1) с клинико-морфологическими и иммунофенотипическими характеристиками рака молочной железы. / С.В. Чулкова, Е.Н. Шолохова, И.В. Поддубная, И.С. Стилиди, Н.Н. Тупицын // Современная онкология. —2022. — Т. 24. — №. 3. — С. 362-367 (Журнал ВАК, SCOPUS).

8. Кожоналиева А.М. Иммуно-морфологическая характеристика костного мозга у больных раком яичников. / А.М. Кожоналиева, **С.В. Чулкова**, И.С. Стилиди, Е.В. Артамонова, И.В. Поддубная, О.П. Колбацкая, Н.А. Купрышина, Е.В. Егорова, Н.Н. Тупицын // Современная онкология. Т. 24. — №1. — С. 73-79. — 2022 (Журнал ВАК, SCOPUS).

9. **Чулкова, С.В.** Иммунологическая характеристика инвазивного рака шейки матки. / С.В. Чулкова, Е.Н. Шолохова, И.В. Поддубная, И.С. Стилиди, Н.В. Грищенко, Н.Н. Тупицын // Онкогинекология. — 2022.— №.3. — С. 44-56 (Журнал ВАК).

10. Рябчиков, Д.А. Иммунологическая характеристика первичной опухоли и костного мозга у больных раком молочной железы. / Д.А. Рябчиков, **С.В. Чулкова**, С.Д. Желтиков, А.А. Осипова, Н.Н. Тупицын // Медицинский алфавит. — 2022. — Т. 31. — №. 4. — С. 23-27 (Журнал ВАК).

11. **Чулкова, С.В.** Иммунофенотипические особенности молекулярных подтипов рака молочной железы. / С.В. Чулкова, Е.Н. Шолохова, И.В. Поддубная, Е.В. Артамонова, А.В. Семьянихина, И.С. Стилиди, Н.Н. Тупицын // Медицинский алфавит. — 2022. — №. 26. — С. 20-26 (Журнал ВАК).

12. **Чулкова, С.В.** Экспрессия мономорфных HLA-детерминант, трансферринового рецептора 1 (TfR1) при молекулярных подтипах рака молочной железы. / С.В. Чулкова, Е.Н. Шолохова, И.В. Поддубная, И.С. Стилиди, Н.Н. Тупицын // Российский биотерапевтический журнал. — 2022. — Т.21. — №. 4. — С. 50-62 (Журнал ВАК).

13. **Чулкова, С.В.** Взаимосвязь лимфоидных популяций (инфильтрации) первичной опухоли с иммунными реакциями в костном мозге у больных раком молочной железы. / **С.В. Чулкова**, Е.Н. Шолохова, И.В. Поддубная, И.С. Стилиди, А.В. Егорова, Н.А. Козлов, Н.Н. Тупицын // Российский биотерапевтический журнал. — 2023. — Т.22. — №1. — С.49-61 (Журнал ВАК).

14. Свидетельство о государственной регистрации базы данных RU2023620846, Российская Федерация. База данных клинических, иммуноморфологических, молекулярно-биологических параметров при раке яичников / **С.В. Чулкова**, Е.Н. Шолохова, Н.Н. Тупицын. Правообладатели ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России — 202362084610, заявл. 01.03.2023, опубл. 10.03.2023. Бюл. №3

15. Свидетельство о государственной регистрации базы данных RU2023620847, Российская Федерация. База данных клинических, иммуноморфологических, молекулярно-биологических параметров при раке молочной железы. / **С.В. Чулкова**, Е.Н. Шолохова, Н.Н. Тупицын. Правообладатели ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России — 2023620537, заявл. 01.03.2023, опубл. 10.03.2023. Бюл. №3