

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

БЕРДОВА ФАРАНГИЗ КАРАМШОЕВНА

**«ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО
СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ
ПЕРВИЧНО-ОПЕРАБЕЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ»**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Тупицын Николай Николаевич

Москва - 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1 Характеристика больных раком молочной железы	38
2.2 Виды и объем лечения больных раком молочной железы, включенных в исследование	42
2.3 Методы исследования	45
2.3.1 Морфологическое исследование костного мозга	47
2.3.2 Иммунофенотипирование костного мозга	48
2.4 Статистическая обработка	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	52
3.1 Факторы прогноза при раке молочной железы	52
3.1.1 Клинические факторы прогноза	53
3.1.2 Роль молекулярных подтипов рака молочной железы в прогнозе заболевания	59
3.2 Роль субпопуляций лимфоцитов костного мозга в прогнозе рака молочной железы	66
3.2.1 Субпопуляции В-лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы в прогнозе заболевания	66
3.2.2 Т- и NK-клеточные субпопуляции лимфоцитов костного мозга в прогнозе рака молочной железы	70
3.3 Взаимосвязь костномозговых субпопуляций лимфоцитов у больных раком молочной железы с молекулярными подтипами заболевания	77
3.4 Иммунологические факторы прогноза при люминальном раке молочной железы	86

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
ВЫВОДЫ	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак молочной железы занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости среди женщин во всем мире [1].

В последние годы применение антител к ингибиторам контрольных точек явилось прорывной технологией, которая позволила улучшить результаты лечения целого ряда онкологических заболеваний. Однако при раке молочной железы применение данного подхода пока не дало каких-либо разительных результатов.

Последние 20 лет ознаменовались внедрением в клиническую практику молекулярной классификации рака молочной железы, основанной на экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, HER2/neu, пролиферативного индекса Ki-67 и т.д. Это позволило выделить 5 молекулярных типов с различным прогнозом и ответом на терапию [2].

Несмотря на большое внимание к иммунологии и молекулярной биологии рака молочной железы, результаты лечения этого грозного недуга всё ещё оставляют желать лучшего, так как процесс в определенных ситуациях может возобновляться.

Одной из причин отсутствия прорывов в улучшении результатов лечения рака молочной железы можно считать отсутствие должного внимания к иммунной системе костного мозга. А ведь хорошо известно, что костный мозг является своего рода неводом для рассеянных в кровотоке циркулирующих опухолевых клеток. Попадая в костный мозг, эти клетки могут годами и десятилетиями там находиться в спящем состоянии, а затем под действием не всегда известных факторов активизироваться и давать рост отдаленным метастазам [2,3].

Способность костного мозга очень длительное время сдерживать рассеянные в нем опухолевые клетки – это хорошо известный факт. Однако механизмы этого явления не известны [3].

Костный мозг является резервуаром для эффекторных клеток памяти, и в этом смысле исследование Т-клеточного и В-клеточного звеньев иммунитета в костном мозге могло бы пролить свет на роль Т-клеток в сдерживании прогрессирования опухоли [3]. Известны особенности ряда звеньев врожденного Т-клеточного иммунитета при опухолях. И, наконец, роль НК-клеток костного мозга также нельзя приуменьшать, о чем свидетельствуют многочисленные данные литературы.

Совершенно не изучена роль В-лимфоцитов костного мозга, плазматических клеток, В-клеток врожденного иммунитета, то есть В1-лимфоцитов.

Цель исследования

Изучить взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов костного мозга с прогнозом заболевания больных операбельным раком молочной железы.

Задачи исследования

1. Изучить субпопуляции В-лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы и оценить их прогностическое значение при РМЖ.
2. Оценить показатели выживаемости у больных раком молочной железы в зависимости от особенностей субпопуляционного состава и количественного содержания Т-лимфоцитов костного мозга.
3. Оценить результаты лечения РМЖ и изучить их связь с клинико-морфологическими и иммуногистохимическими характеристиками опухоли.
4. Сопоставить взаимосвязь субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга с молекулярными подтипами РМЖ.

Научная новизна

1. Впервые установлена роль субпопуляций костномозговых Т- и В-лимфоцитов в прогнозе рака молочной железы. В-клетки и В-линейные предшественники достоверно взаимосвязаны с показателями общей выживаемости больных – при сниженных уровнях клеток В-линии показатели общей выживаемости достоверно более низкие;

Уровни Т-клеток также взаимосвязаны с показателями выживаемости: сниженные значения CD4-лимфоцитов ассоциированы с низкими показателями общей выживаемости, наличие активированных CD8-лимфоцитов характерно для более высоких показателей выживаемости без прогрессирования.

2. Выявлено отсутствие взаимосвязи молекулярных подтипов рака молочной железы с уровнем Т- и В-лимфоцитов костного мозга. Исключение составили В1-лимфоциты, достоверно более низкие уровни которых отмечены при трижды негативном раке.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе данные могут иметь практическое значение.

Во-первых, связь субпопуляций лимфоцитов с прогнозом (общей выживаемостью) позволяет разрабатывать возможные пути коррекции существующих иммунодефицитов, что будет способствовать увеличению продолжительности жизни больных раком молочной железы при различных молекулярных подтипах заболевания.

Во-вторых, достоверная ассоциация низких уровней В1 клеток с неблагоприятным молекулярным вариантом (тройной-негативный) открывает возможности поиска методов стимуляции этой популяции с целью иммунокоррекции.

Методология и методы исследования

Настоящая работа основана на анализе комплексного обследования и лечения 107 больных раком молочной железы, проходивших лечение в отделении опухолей молочных желез в основном в период 2010-2016 гг. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288). КМ для исследования получен методом стеральной пункции. Исследования проведены у больных, которые до операции не получали лучевую терапию, химиотерапию или гормонотерапию. Все случаи РМЖ классифицированы клинически по системе TNM в соответствии с требованиями Международного противоракового общества (UICC, версия 2002 г.) и описаны гистологически на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в отделе патоморфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России.

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 FACSCANTO II. Анализ полученных данных проведен с помощью программы FCS 3.

Для статистической обработки результатов выполненного исследования разработан специальный кодификатор и использовалось программное обеспечение SPSS, v.21. Уточнение длительности жизни больных проводилось

путем персональных опросов или через бюро ЗАГС. По возможности были уточнены длительность жизни больных, длительность периода без прогрессирования, длительность безметастатического периода и т.д. Сравнение кривых выживаемости (по Каплан-Майер) проводили статистическими методами с оценкой достоверности различий по Лог-ранк, Бреслоу, Тарон-Уоре. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

Субпопуляции лимфоцитов костного мозга играют роль в прогнозе рака молочной железы. Наиболее важное влияние на общую выживаемость оказывают костномозговые В-лимфоциты (CD19+) и их предшественники (CD19+CD10+, CD19+CD38+). Сниженное содержание этих клеток ассоциировано с достоверно более низкой общей выживаемостью больных раком молочной железы.

Т-лимфоциты костного мозга играют неоднозначную роль в прогнозе рака молочной железы. Сниженные уровни Т-хелперных лимфоцитов ассоциируются с худшими показателями общей выживаемости больных раком молочной железы ($p=0,028$). Близкая к достоверной связь с показателями выживаемости без прогрессирования установлена для активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+HLA-DR+). У больных с содержанием этих клеток в костном мозге выше 10% отмечены более продолжительные периоды без прогрессирования при сроках наблюдения до 8 лет.

Общее содержание зрелых Т-клеток (CD3+) в костном мозге больных раком молочной железы при сроках наблюдения более 6 лет имеет тенденцию к взаимосвязи с показателями выживаемости без прогрессирования ($p=0,08$). Повышенные уровни зрелых Т-клеток ассоциированы с низкими показателями выживаемости.

Единственной иммунологической субпопуляцией лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы, взаимосвязанной с молекулярными подтипами рака молочной железы, является субпопуляция В1 (CD19+CD5+)

лимфоцитов костного мозга. Связь этой популяции с показателями выживаемости напоминает таковую для молекулярных подтипов, то есть имеет место ассоциация с выживаемостью без прогрессирования, а не с общей выживаемостью, как для остальных В-клеток костного мозга.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (Медицинские науки), направлению исследований п.10 «Оценка эффективности противоопухолевого лечения на основе анализа отдаленных результатов».

Степень достоверности и апробации результатов

Число больных, включенных в исследование, подробный анализ результатов лечения, а также использование современных методов статистической обработки полученных данных делают полученные результаты достоверными. В работе использовались данные 107 пациентов, соответствующие критериям включения и исключения. По теме диссертации опубликовано 3 научные работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Основные положения диссертации представлены в виде доклада на симпозиуме «Клиническая и трансляционная онкология».

Определение субпопуляций лимфоцитов костного мозга, в частности, тех, которые взаимосвязаны с прогнозом заболевания- CD3, CD4, CD8+ HLA-DR, CD19, CD19+CD10+, CD19+CD38+, CD19+CD5+ - внедрено в практику иммунологических исследований костного мозга в лаборатории иммунологии гемопоэза отдела клиничко-лабораторной диагностики НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация диссертации состоялась «06» июля 2022 года на совместной научной конференции онкологического отделения хирургических методов лечения №15 (комбинированного лечения опухолей молочной железы), онкологического отделения хирургических методов лечения №16, онкологического отделения пластической хирургии, онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтического) №1, онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтического) №2, онкологического отделения хирургических методов лечения № 5 (эндокринной онкологии), лаборатории иммунологии гемопоза отдела клиничко-лабораторной диагностики НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова и отделения радиотерапии НИИ клинической и экспериментальной радиологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, клинической характеристики и методов обследования больных, анализа и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 141 источников, приложений. Работа иллюстрирована 20 таблицами, 28 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Иммунологические подходы к диагностике и терапии рака молочной железы в настоящее время стали неотъемлемой частью лечебных протоколов. Это обусловлено глубоким пониманием патогенетических особенностей рака молочной железы, молекулярно-биологической основы возникновения заболевания, роли врожденного и приобретенного иммунитета в диссеминации и прогрессии опухоли.

Исследованию иммунной системы больных раком молочной железы, ее роли при различных молекулярных подтипах рака и возможностей использования этих данных в разработке терапевтических подходов посвящено много работ.

Иммунологические исследования были первоначально сосредоточены на особенностях субпопуляционного состава лимфоцитов крови, затем – интратуморальных лимфоцитов и, наконец, - иммунной системы костного мозга пациентов.

Несмотря на то, что исследования костного мозга проводятся уже более 3 десятилетий, понимания роли костного мозга в противоопухолевом иммунитете до сих пор нет. Более того, даже относительно норм содержания главных субпопуляций костного мозга единство мнений в литературе отсутствует. Это обусловлено несколькими основными причинами. Во-первых, морфологическими и иммунологическими различиями структуры костного мозга в различных костях у человека, во-вторых, возрастными особенностями, и, в-третьих, миграция лимфоцитов может оказывать значительное влияние на процентное содержание Т-, В-лимфоцитов и ряда других клеточных типов в костном мозге. Прежде, чем переходить к анализу особенностей субпопуляционного состава лимфоцитов при опухолях, рассмотрим некоторые положения, касающиеся нормального костного мозга.

Следует отметить, что референсные значения относительно нормы для субпопуляций лимфоцитов различаются по данным ряда авторов. Субпопуляции Т-лимфоцитов костного мозга в детском возрасте подвержены колебанию в

широких пределах в зависимости от возраста. Обычно гематологи сходятся в том, что соотношение CD4/CD8 в костном мозге ниже, чем в периферической крови: оно составляет менее 1 или менее 1,4 [4]. По данным Van Oye [5], Малаховского Ю.Е. [6], С.А. Луговской [7], обследовавших детей до 1 года, повышение количества лимфоцитов в детском возрасте по сравнению с уровнями лимфоцитов у взрослых, вероятно, обусловлено более высоким содержанием В-клеток у детей [8]. Отмечены более высокие уровни В-клеток у детей до 5-10 лет [6]. Г.И Козинец и В.А. Макарова (1998) считают основным отличием костного мозга детей от костного мозга взрослых увеличение процентного содержания лимфоцитов в первые 5-7 лет жизни (за исключением периода новорожденности) [9]. По данным С.А.Луговской и соавт. (2005) [7] диапазон Т-клеток (CD3) в костном мозге взрослых составляет 21-51%, CD4 – 14-30%, CD8 – 11-28%, CD19 – 7-20%, CD10 – 0,5-15%. По данным Гривцовой Л.Ю. и соавт. (2018) [10] средние уровни Т- и В-лимфоцитов в костном мозге при отсутствии онкологической патологии (мастопатии) составили: CD3 – $57,3 \pm 3,7\%$, CD4 – $26,3 \pm 3,1\%$, CD8 – $30,8 \pm 2,1\%$, CD19 – $19,9 \pm 2,7\%$.

Мы всё ещё далеки от понимания роли костного мозга как иммунного органа у онкологических больных. Различия в нормах по клеточному составу, определяемому морфологически (миелограмма) и иммунологически по субпопуляциям лимфоцитов могут быть обусловлены ещё и тем, что в различных губчатых костях отмечается различный состав миелокариоцитов. В экспериментальных работах на мышах было показано, что большинство CD8+ Т-клеток сосредоточено в костном мозге позвонков [11], так как именно в них содержится наибольшее количество миелокариоцитов. Вместе с тем, пропорция этих клеток вполне сравнима в различных изученных костях (большеберцовая кость, бедренная кость, кости таза, грудина, лучевая кость, плечевая кость, кости черепа и позвонки).

Костному мозгу как периферическому лимфоидному органу уделяется всё большее внимание в публикациях последних лет. Отмечается, что сосредоточенность только на генерации В-лимфоцитов при описании иммунных

функций костного мозга является упрощением [12]. Репертуар Т-клеток памяти в костном мозге включает специфичности к антигенам, встреча организма с которыми была несколько десятков лет тому назад, - корь, паротит, краснуха [13, 14]. Организация иммунологической памяти происходит при участии стромы костного мозга [15, 16]. Доказано, что костный мозг является главным резервуаром и участком рекруитмента CD8⁺ Т-клеток центральной памяти [17, 18]. Выделение Т-клеток памяти на основании изоформ CD45 предложено достаточно давно [19, 20], Т-клетки центральной памяти обеспечивают память для вторичных иммунных реакций, а эффекторные Т-клетки памяти непосредственно обеспечивают иммунитет [21,22], имеются функциональные и иммунофенотипические различия этих клеток [23-26]. В костном мозге человека присутствует подкласс покоящихся ранних Т-клеток памяти [27]. В костном мозге отмечается более высокий процент В-клеток памяти, чем в крови (19% и 4%). Есть субпопуляции плазматических клеток, которые ограничены костным мозгом, продуцируют IgG и являются CD19-негативными. Этот подкласс костномозговых клеток является стабильным в течение длительного времени [28].

Вопросам миграции лимфоцитов в костный мозг и из него в кровь посвящен обзор Pabst R [29]. Рассмотрение данного вопроса крайне важно [30, 31], так как костный мозг является типичным «первичным лимфоидным органом», продуцирующим лимфоидные клетки, независимые от антигенов. Примерно 12% всех лимфоидных клеток человека обнаруживаются в костном мозге в любой момент времени (и лишь 2% в периферической крови). Огромное количество Т-лимфоцитов мигрирует в костный мозг [32-34] и частично возвращается затем в кровь. Многие из этих лимфоцитов являются CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками памяти. Через несколько дней после иммунизации большое количество плазматических клеток и их предшественников мигрирует в костный мозг, где они теряют миграционный ответ на CXCL-12 и CXCL9. То есть, обогащение CD19⁺ В-клетками в костном мозге по сравнению с кровью и вторичными лимфоидными органами происходит не только за счет локальной продукции В-клеток.

Костный мозг является главным компонентом костных полостей и характеризуется различиями в количестве и строении в зависимости от возраста человека. Как известно, существует желтый костный мозг, в основном состоящий из адипоцитов, и гемопоэтический красный костный мозг. У человека красный костный мозг обнаруживается на протяжении всего скелета у плода и в первые годы жизни. Затем он постепенно замещается желтым костным мозгом. У взрослых красный костный мозг сохраняется в ребрах, ключице, костях черепа, таза, позвонках, а также в грудине и эпифизах бедренных костей, а также плечевых костей.

Красный костный мозг – это место продукции эритроцитов, тромбоцитов и миелоидных клеток, включая дендритные клетки, а также различных субпопуляций лимфоцитов. Красный костный мозг часто считается аналогом тимуса для Т-лимфоцитов, то есть органом, который генерирует и экспортирует В-лимфоциты. Ограничение роли костного мозга продукцией В-лимфоцитов является упрощением, необходимо учитывать также особенности миграции лимфоцитов в костный мозг [12]. Т-лимфоциты мигрируют в костный мозг из периферической крови. В-лимфоциты и, в особенности, плазматические клетки могут сохранять жизнеспособность в костном мозге в течение длительного времени.

Очень важно отметить, что костный мозг человека является одним из наиболее крупных резервуаров Т-клеток. Примерно 12% лимфоцитов находятся в костном мозге, и только 2% в периферической крови, примерно 41% в лимфатических узлах, 15% в селезенке, 11% в тимусе и т.д. Поступление лимфоцитов хорошо изучено в лимфатические узлы, миндалины и пейеровы бляшки, то есть в органы и ткани с наличием высоких эндотелиальных венул (HEV). Лимфоидные и гемопоэтические органы, не имеющие HEV, такие как селезенка и костный мозг, а также нелимфоидные органы – легкие, печень, желудочно-кишечный тракт также включены в динамику миграции лимфоцитов. Следует отметить, что костный мозг не интегрирован в лимфатическую систему, так как не имеет ни афферентных ни эфферентных лимфатических сосудов.

Для изучения миграции вновь сформированных лимфоидных клеток из селезенки в костный мозг у здоровых молодых свиней спустя 1-4 дня после введения меченых тритием клеток селезенки были изучены как лимфоидные, так и нелимфоидные органы методом автордиографии. Через один день после селективного мечения селезенки 11% всех вышедших из неё малых лимфоцитов были в костном мозге, а на 4-й день – лишь 6,4%. В костном мозге эти клетки были представлены как незрелыми (36%), так и зрелыми (11%) плазмочитами [35, 36]. Количество происшедших из селезенки плазматических клеток в костном мозге было более высоким при внутривенном введении антигена: в 1-ый день их было 85×10^6 , а на 7-й день - 257×10^6 , то есть значительно больше, чем в других лимфоидных органах [35]. Следовательно, вновь сформированные лимфоциты и предшественники плазматических клеток поступают из селезенки в костный мозг.

Feuerer [37] установил в 2003 году удивительный факт того, что наивные Т-лимфоциты с антиген-специфичным Т-клеточным рецептором могут быть первично иммунизированы в костном мозге при взаимодействии с дендритными клетками [38-41], которые презентуют антигены, находящиеся в крови. Первичные ответы CD4 и CD8 клеток генерируются в костном мозге при отсутствии классических структур вторичных лимфоидных органов, то есть костный мозг может быть альтернативным органом первичной иммунизации наивных Т-клеток. Более того, CD4 клетки памяти в костном мозге способствуют созреванию антител, что показано в экспериментальных исследованиях [42]. Клиническое значение этих данных заключается в том, что создаются цитотоксические Т-клетки с защитным противоопухолевым иммунитетом, а также иммунологической памятью.

Т-клетки памяти в костном мозге человека находятся в покоящемся состоянии [43]. Репертуар Т-клеток памяти у людей в возрасте примерно 64 лет включает специфичности, с которыми организм встречался десятилетия тому назад (корь, паротит, краснуха), варьируя от 10^6 до 10^8 клеток во всем костном мозге индивидов [13, 44]. У мышей костный мозг является главным резервуаром и сайтом рекруитмента CD8⁺ Т-клеток центральной памяти [17]. Важно то, что

имеет место предпочтительный хоминг специфичных CD8⁺ Т-клеток памяти в костный мозг при ряде инфекций и опухолях [36,42,45-52]. Таким образом, Т-клетки памяти запускают ответы Т-клеток центральной памяти в костном мозге [53]. Хотя различные субпопуляции Т-лимфоцитов охарактеризованы во многих органах, субпопуляции Т-клеток, находящихся в костном мозге до настоящего времени не изучены.

Особый интерес представляют костномозговые В-лимфоциты и плазматические клетки, не экспрессирующие CD19. Через 4-6 дней после иммунизации плазматические клетки и их предшественники выходят из селезенки и поступают в костный мозг. После прибытия в костный мозг плазматические клетки теряют ответ на хемокины и становятся оседлыми клетками [29]. Сравнили уровни В-клеток памяти, специфичных к токсоиду столбняка, в крови, селезенке, миндалинах и костном мозге у пациентов, которые были вакцинированы много лет назад [29]. Наибольшее количество этих клеток обнаружено в селезенке ($99,1 \times 10^9$) и небных миндалинах ($1,1 \times 10^9$) в сравнении с костным мозгом ($6,6 \times 10^8$) и кровью ($8,2 \times 10^7$). CD19-негативные плазматические клетки обнаруживались только в костном мозге и имели зрелый иммунофенотип, низкую экспрессию CD95 и повышенную экспрессию BCL-2, что указывает на длительную стабильность данного подкласса клеток в костном мозге человека [54].

Участие костного мозга в миграции лимфоцитов существенно расширяет классическое представление относительно его функции как первичного лимфоидного органа. Костный мозг является также местом, где Т-лимфоциты могут быть первично иммунизированы. У человека CD4⁺ и в особенности CD8⁺ Т-клетки длительное время сохраняют жизнеспособность в костном мозге. Помимо CD19⁺ плазматических клеток костный мозг здорового человека обогащен CD19-негативными плазматическими клетками со зрелым иммунофенотипом. Эти клетки не подвержены мобилизации в кровь в ходе иммунных ответов после вакцинации.

Одной из основополагающих работ по оценке роли костного мозга в генерировании эффекторов иммунного ответа является работа Маркуса Феуерера и соавторов (2003) [37]. В ней представлены как экспериментальные данные на мышах, так и результаты исследований при раке молочной железы у женщин. Наивные антиген-специфичные Т-клетки находят свой дом в костном мозге, где они могут быть примированы. Презентирование антигенов Т-клеткам в костном мозге опосредуется резидентными CD11c⁺ дендритными клетками. Они очень эффективны в захвате экзогенных антигенов, происходящих из крови, а также их процессинге посредством молекул главного комплекса гистосовместимости классов I и II. Активация Т-клеток коррелирует с формированием кластеров дендритных клеток с Т-клетками в строме костного мозга. Первичные ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, генерированные в костном мозге, происходят при отсутствии вторичных лимфоидных органов. Эти ответы не являются толерогенными и приводят к генерации цитотоксических Т-клеток, протективному противоопухолевому иммунитету и иммунологической памяти. Эти данные освещают уникальность костного мозга как органа важного для гемато- и лимфопоэза, а также для системного Т-клеточного иммунитета.

Считается, что уникальный клеточный состав и строение микроокружения Т-клеточных зон вторичных лимфоидных органов являются необходимыми для первичных Т-клеточных ответов [55]. В этих зонах наивные Т-клетки встречают нагруженные антигеном дендритные клетки [56, 57]. Эффективное сканирование этих клеток циркулирующими Т-клетками может не быть уникальным для Т-клеточных зон и предполагаемому разделению труда между первичными и вторичными лимфоидными органами может быть не столь четко разграничено как предполагалось до настоящего времени.

Как и селезенка, костный мозг васкуляризирован кровеносными, а не лимфатическими сосудами и является частью сети рециркуляции лимфоцитов [58]. Более того, ряд авторов наблюдали обогащение антиген-специфических Т-клеток памяти в костном мозге [58-62,17], что предполагает, что костный мозг является предпочтительным местом миграции и/или селективной задержки Т-

клеток памяти. Опухолеспецифичные Т-клетки костного мозга вовлечены в контроль дремлющего состояния опухолевых клеток [60,3] и проявляют терапевтическую активность [63,64]. На основе этих наблюдений Feuerer M. и соавторы (2003) предположили, что костный мозг является не только гаванью для антиген-специфичных Т-клеток памяти, но также и сайтом инициации Т-клеточных ответов. Адоптивный перенос активированных лимфоцитов костного мозга вызывает противоопухолевый иммунитет в костном мозге больных множественной миеломой [65]. В последнее время сформировалось новое направление работ по повышению специфического противоопухолевого иммунитета – костномозговая вакцинация [66, 67]. Помимо этого, введение в костный мозг клеток аллогенного костного мозга, как было доказано, является эффективным методом лечения аутоиммунных болезней в эксперименте [68].

Feuerer M. и соавторами [37] продемонстрировано, что наивные Т-клетки, экспрессирующие трансгенный овалбумин-специфичный рецептор, характеризуются хомингом в паренхиму костного мозга при их перенесении наивным (B6) мышам дикого типа или спленэктомизированным аллимофластически мутантам (Map3k14aly/aly) мышам C57BL/6. Перенесенные CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки формируют многоклеточные кластеры с резидентными антиген-презентирующими клетками костного мозга, становятся активированными, пролиферируют и дифференцируются в эффекторные клетки и клетки памяти. Авторы предположили, что костный мозг сходно со вторичными лимфоидными органами содержит микроокружение, позволяющее осуществлять тонкие взаимодействия между антиген-презентирующими дендритными клетками и наивными циркулирующими антиген-специфичными Т-клетками, что ведет к индукции первичного иммунного ответа и ответа CD8⁺ Т-клеток памяти.

Работы по изучению противоопухолевого иммунитета можно разделить на таковые, сосредоточенные, главным образом, на приобретенном иммунитете, и на исследования врожденного иммунитета.

Не останавливаясь в деталях на работах, посвященных субпопуляциям лимфоцитов крови и интратуморальных лимфоцитов (этих работ очень много, для

справки можно обратиться к соответствующим обзорам), обратимся непосредственно к публикациям по теме костномозговых эффекторных клеток противоопухолевого иммунитета.

Хорошо известно, костный мозг является, в первую очередь, центральным гемопоэтическим органом, в котором после рождения человека происходит генерация кроветворных клеток всех ростков гемопоэза. Костный мозг является в то же время и центральным лимфоидным органом, в котором возникают и созревают предшественники В-лимфоцитов [44], а также самые ранние клетки Т-лимфоцитопоэза и НК-клеточного звена. Вместе с тем, костный мозг является одновременно и периферическим лимфоидным органом, в котором сосредоточены многие эффекторные типы клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета, а также клетки памяти.

Исследованию иммунных клеток костного мозга при опухолях посвящен целый ряд работ. Мы остановимся на зрелых Т-лимфоцитах адаптивного иммунитета, особой субпопуляции $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, сочетающей признаки как врожденного, так и приобретенного иммунитета, НК-клетках, В-лимфоцитах (как врожденного, так и приобретенного звеньев иммунитета), а также их предшественниках.

Популяция лимфоидных клеток костного мозга гетерогенна и включает как незрелые лимфоидные предшественники, так и зрелые антителопродуцирующие В-клетки, а также периферические Т-лимфоциты. Наиболее зрелые этапы В-клеточной дифференцировки представлены в костном мозге плазмочитами (около 1%). Они характеризуются длительной массивной продукцией антител к антигенам, которые повторно поступают в организм. Отмечается селективный хоуминг зрелых CD8⁺-лимфоцитов в костный мозг (CD4/CD8<1). Популяция CD8⁺-лимфоцитов костного мозга отличается по иммунофенотипу от CD8⁺-лимфоцитов крови [69]. Наибольшие различия касаются маркеров CD11b, которые отсутствуют на CD8⁺-лимфоцитах костного мозга и напротив, определяются на CD8⁺-лимфоцитах крови. Молекула HLA-DR почти не экспрессируется на CD8⁺-лимфоцитах крови (4%), однако более выражена на

данной популяции лимфоцитов костного мозга (15,4%). Фенотип CD4⁺-лимфоцитов крови и костного мозга не различается. Зрелые Т-лимфоциты костного мозга осуществляют контроль над процессами пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток и клеток костной ткани как путем контактных взаимодействий, так и опосредовано через продукцию цитокинов [70, 71].

У онкологических больных увеличены уровни Т-клеток в костном мозге [59, 72-76]. Распознавание опухолевых антигенов Т-клетками костного мозга может являться первым этапом противоопухолевого иммунного ответа. Всё это позволяет рассматривать костный мозг как главный орган становления иммунного ответа на опухоль и его интенсивности [37,76]. Наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге онкологического больного поддерживает антигенную стимуляцию. Таким образом, обнаружение зрелых Т-клеток, подобных таковым в периферической крови, сделанное Fauci A. et al., явилось в последующем важным этапом в понимании роли костного мозга у онкологических больных. Т-клетки проникают в паренхиму костного мозга как часть длительно живущего рециркулирующего пула в виде небольшой фракции, менее 10% [77]. Важно то, что уровень зрелых Т-клеток в костном мозге коррелирует с эффективностью противоопухолевого ответа [37]. Предприняты попытки использования Т-клеток костного мозга, взаимодействующих с опухолью, при метастатическом раке молочной железы [78].

Кроме Т-клеток с $\alpha\beta$ Т-клеточным рецептором, обеспечивающих цитолитическую функцию и МНС-опосредованное распознавание антигена, в костном мозге присутствуют клетки с иным функциональным механизмом, включая NK-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки [79-82]. В исследовании Diefenbach A. [83] обнаружено увеличение уровня $\gamma\delta$ Т-клеток у детей с ОЛЛ. Этому типу клеток уделяется особое значение в противоопухолевом иммунитете. TCR $\gamma\delta$ -лимфоциты распознают иные, нежели TCR $\alpha\beta$ -позитивные клетки антигенные мишени на опухоли и, тем самым, обеспечивают эффективную и быструю элиминацию злокачественных клеток [84-86]. Распознавание опухолевых антигенов и

последующая деструкция злокачественных клеток осуществляется Т γ δ -лимфоцитами вне контекста классических молекул HLA-I и II класса. Мишенями иммунного распознавания Т γ δ -лимфоцитов являются родственные полипептидным цепям HLA I класса молекулы A и B (MICA/MICB), а также UL-16-связывающие белки 1-3 (ULBP1-3), которые экспрессированы на клетках многих опухолей. Доказано, что Т γ δ -лимфоциты способны осуществлять цитотоксическое действие в отношении этих опухолей [31].

Исследование субпопуляций лимфоцитов костного мозга при скелетной саркоме Юинга у 40 больных выявило повышение уровня Treg (CD4+CD25^{hi}FoxP3⁺) при распространенных стадиях, по сравнению с пациентами, имеющими локализованную стадию (5,0 vs 3,3%, p=0,01) [88]. Вероятно, это обусловлено ингибированием Treg-клетками NK-клеточного лизиса [89]. По данным этих авторов уровень CD56-позитивных лимфоцитов в костном мозге коррелировал с уровнем безрецидивной выживаемости. В группе больных с низкими уровнями или отсутствием CD56⁺клеток безрецидивная выживаемость была выше – 69%, по сравнению с пациентами, у которых были высокие уровни этого маркера – 30%, p=0,024. При низком уровне или отсутствии CD56 выявлялись локализованные стадии (за исключением опухолей с поражением костей таза) в 100%, в то время как в группе с высоким уровнем этого маркера локализованные стадии наблюдались только в 40%, p=0,02. Найдено также, что CD56 является независимым маркером у пациентов с локализованной стадией, указывающим на риск развития рецидива, p=0,006 [89].

Противоопухолевый иммунитет связан с формированием клона антигенспецифических Т-эффекторов – ЦТЛ, способных распознавать своими рецепторами и убивать опухолевые клетки, несущие на поверхности определенный пептид туморассоциированных антигенов (ТАА) в сочетании с МНС I. Большинство опухолей успешно избегают иммунологического надзора. В некоторых случаях опухолевые клетки не экспрессируют на поверхности иммуногенных пептидов, в других случаях – презентация антигенного пептида невозможна из-за отсутствия молекул МНС I или для индукции ответа Т-

лимфоцитов не хватает адгезионных или костимулирующих молекул. Опухолевые клетки могут утрачивать поверхностные ТАА вследствие мутаций, будучи генетически не стабильными [90]. Способность опухоли «ускользнуть» от иммунологического надзора обусловлена отсутствием специфических антигенов, высокой скоростью деления злокачественно трансформированных клеток, секрецией супрессорных клеток и низкой биодоступностью для иммунотерапии [91].

ЦТЛ убивают опухолевые клетки только в случае достаточно высокой экспрессии молекул МНС I. НК-клетки, напротив, эффективны в отношении клеток, лишенных МНС I, так как НК-клетки несут на поверхности киллер-ингибирующие рецепторы (KIR), которые связываются с МНС I. Варианты опухолевых клеток, которые имеют низкую экспрессию МНС I, менее чувствительны к CD8⁺ Т-лимфоцитам, но более чувствительны к НК-клеткам. Специфический иммунный клеточный ответ на антигены опухолевых клеток опосредован CD8⁺ Т-лимфоцитами. Они распознают антигенные пептиды в комплексе с МНС I на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Дендритные клетки захватывают и перерабатывают опухолевые антигены и презентуют опухолевые пептиды в комплексе с МНС I и МНС II. При этом, дендритные клетки, взаимодействуют с Т-хелперами, и эффективно презентуют ТАА в комплексе с МНС I цитотоксическим лимфоцитам. Усиленная пролиферация приводит к накоплению клона ЦТЛ, способных распознавать соответствующие антигенные пептиды в сочетании с МНС I на поверхности любых клеток-мишеней и убивать их уже без содействия костимуляционных молекул. К сожалению, далеко не все ТАА проявляют иммуногенность, достаточную для формирования клона ЦТЛ [90].

В работе Т.В.Горбуновой показаны особенности субпопуляционного состава костномозговых лимфоцитов врожденного и приобретенного иммунитета у детей при рабдомиосаркоме, саркоме Юинга, а также в сравнении с костным мозгом при неопухолевой патологии [92-94]. Эффекторные лимфоциты костного мозга детей больных рабдомиосаркомой, опухолями семейства саркомы Юинга

(ОССЮ) и у детей, не имеющих онкологической патологии, различаются по субпопуляционному составу Т-цитотоксических клеток, НК-клеток и TCR $\gamma\delta$ -клеток.

Характерным для субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга при рабдомиосаркоме у детей в сравнении с контрольной группой является повышение уровней, активированных Т-цитотоксических клеток CD3+CD8+HLA-DR+ (37,1% и 12,2%, $p=0,001$), повышение популяции зрелых $\gamma\delta$ Т-клеток (15,8% и 9,2%, $p=0,007$), а также снижение в два раза популяции Т-хелперных клеток (CD4+), экспрессирующих молекулу адгезии CD62L (17,6% и 33,5%, $p=0,015$). Субпопуляционный состав костного мозга при ОССЮ у детей отличался от значений в группе контроля, повышением уровня зрелых Т-цитотоксических лимфоцитов (68,5% и 50,5%, $p=0,000$) и снижением CD4+ Т-хелперных клеток (26,9% и 39,3%, $p=0,01$), что отразилось на более низких уровнях иммунорегуляторного индекса. В группе детей с ОССЮ цитотоксическая субпопуляция зрелых Т-лимфоцитов отличалась признаками активации на основании экспрессии HLA-DR ($p=0,001$), но не на основании экспрессии CD25 в сравнении с контрольной группой. Содержание Т-цитотоксических лимфоцитов CD3+ CD8+CD57+ костного мозга при ОССЮ у детей было повышено по сравнению с группой контроля ($p=0,028$).

На основании проведенного анализа установлены достоверные различия в субпопуляционном составе лимфоцитов костного мозга при рабдомиосаркоме в сравнении с ОССЮ у детей. При ОССЮ выявлено преобладание Т-цитотоксических клеток CD3+ CD8+ (68,5% и 50,5%, $p=0,001$) и более низкие уровни TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов (10,0% и 15,8%, $p=0,01$).

При сопоставлении субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга больных рабдомиосаркомой с факторами прогноза установлены достоверные взаимосвязи. При распространенных стадиях рабдомиосаркомы у детей по сравнению с локализованными опухолями выявлено повышение уровня CD62L-позитивных зрелых Т-лимфоцитов (69,8% и 35,5%, $p=0,016$), снижение НК-клеток (18,6% и 6,9%, $p=0,039$), и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (18,5% и 11,0%, $p=0,019$).

Установлено снижение активированных CD38⁺ Т-цитотоксических клеток (41,7% и 63,2%, p=0,024) и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (7,6% и 12,9%, p=0,016) у больных ОССЮ в группе высокого риска [93].

На основании представленных данных Т.В.Горбунова считает возможным предложить введение в клиническую практику определения уровня $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов костного мозга при рабдомиосаркоме и ОССЮ у детей на этапе диагностики, а также оценить возможности использования препаратов, способных повышать уровни $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в группах высокого риска при рабдомиосаркоме и ОССЮ [93].

Как можно констатировать, исследование субпопуляционного состава лимфоцитов КМ при саркомах у детей фактически положило начало дальнейшей череде работ по изучению субпопуляций костного мозга при солидных опухолях. Надо признать, пока этих работ насчитывается немного, но уже сейчас становится понятным, что это особенная и довольно сложная область исследований. Это поразительно, что выявлены столь выраженные различия в лимфоидных популяциях КМ, особенно в отношении активированных Т-клеток, а также клеток врожденного иммунитета, поэтому интерес к изучению КМ нарастает. Этот вопрос мы рассмотрим ниже, а пока продолжим рассмотрение субпопуляций Т-клеток и их свойств.

Интригующей и интересной субпопуляцией лимфоцитов является CD27⁺CD4⁺, изучение которой активно ведутся при немелкоклеточном раке легкого [95]. Хорошо и известно, что для активации Т-лимфоцитов экспрессия костимуляторной молекулы CD27 необходима, поскольку именно в результате ее взаимодействия с лигандом CD70 происходит дифференцировка с последующим формированием пула Т-клеток памяти, а также с цитотоксическим потенциалом [96, 97]. В экспериментальных моделях установлено, что применение агониста CD27 вызывало пролиферацию Т-клеток, что усиливало противоопухолевый ответ *in vitro* [98]. Интересно, отметить, что маркер CD27 может экспрессироваться как Т-эффекторами, так и регуляторными Т-лимфоцитами в

опухоли, и поэтому CD27+ Т-клеточная популяция предлагается в качестве мишени для иммунотерапии [96].

Интересные данные о субпопуляции CD4+ Т-клеток получены при трижды негативным РМЖ З.Г. Кадагидзе и соавт. [99]. Авторы оценили уровни субпопуляций CD4+ лимфоцитов у больных в зависимости от неoadъювантной терапии. Отмечено увеличение пропорции этих клеток до начала лечения, а затем эти данные сопоставлены с результатами лекарственной терапии. Оказалось, что 1-2 степень патоморфоза сопровождалась большим процентом этих клеток по сравнению с 3-4 степенью патоморфоза ($p = 0,036$). Авторами проанализированы как показатели общей выживаемости, так и выживаемости без прогрессирования. Больные с повышенным содержанием CD4+ Т-клеток имели показатели выживаемости значительно выше [99].

В другом исследовании, касающемся немелкоклеточного рака легкого, в отношении клинической значимости субпопуляции CD4+ Т-клеток получили аналогичные данные, в котором высокие ее уровни ассоциировались с благоприятным прогнозом и показатели общей выживаемости больных были выше. Эти данные подтверждены многофакторным анализом [100].

Немало насчитывается интересных работ по изучению костномозговых популяций лимфоцитов. Так, в своем исследовании Feuerer M. и соавт. изучили популяции Т-клеток у больных РМЖ и здоровых добровольцев [59]. Оказалось, что уровни костномозговых лимфоцитов, CD4+ и CD8+, а в частности, эффекторных клеток памяти, выше при РМЖ по сравнению с нормой, что явилось весьма интересным фактом.

Аналогичную работу выполнили другие ученые, сравнив состав зрелых Т-лимфоцитов у здоровых доноров и больных РМЖ. Авторы установили, что содержание CD3+ лимфоцитов снижено при раке [101]. Напротив, в другой работе, в которой также оценивались субпопуляции костномозговых лимфоцитов при доброкачественной патологии и при РМЖ получены противоположные результаты в отношении уровня CD3+ лимфоцитов [102].

Другая, не менее любопытная работа, выполнена группой ученых под руководством Мкртчян В.А., в которой авторы поставили целью изучить костномозговые популяции Т-лимфоцитов в зависимости от пролиферативной активности клеток РМЖ [103]. По результатам анализа авторы сообщают, что содержание зрелых Т-клеточных субпопуляций достоверно не различалась при разном уровне пролиферативной активности клеток рака. Возникает вопрос. С чем это связано и действительно ли отсутствует данная связь с Т-клетками? Вероятно, требуются дальнейшие исследования этого аспекта.

Следующая популяция клеток, значимая в противоопухолевом ответе и играющая колоссальное значение в реализации цитотоксического потенциала лимфоцитарного звена клеток иммунной системы это субпопуляция CD8+Т - лимфоцитов. Отметим сразу, что эти клетки являются представителями адаптивного иммунитета, выполняя как противовирусную защиту организма, так и протекцию от злокачественных опухолей. Субпопуляция CD8+Т – клеток - эффекторы, они располагают специальной системой цитолитических гранул и перфоринов, которая позволяет осуществлять прямой киллинг опухолевых клеток [104]. К текущему моменту мы располагаем достаточно большим объемом данных в отношении этой популяции Т-клеток. Известно, что эта популяция Т-клеток весьма гетерогенна и включает в себя много различных видов таких как CD8+CD25+ регуляторные Т-клетки, CD8+CD28-, а также CD8+CD12+, экспрессирующие интерлейкин 10 цитотоксические Т-клетки (CD8+IL-10+) [105]. Из данных эксперимента известно, что популяция CD8+CD28- обладает некоторыми особенностями. Оказалось, что CD8+CD28- клетки могут оказывать как цитотоксический эффект, так и супрессивный. Их отличает продукция целого спектра цитокинов, интерлейкина 10, интерлейкина 4, TGF бета, интерферона альфа и гамма [106].

По данным ряда работ, популяция CD8+ клеток изучена в лимфоузлах и в опухоли при разных видах рака и установлено, что имело место выраженная доля CD8+CD28- Т-клеток, которая характеризовалась супрессивным действием [106]. Это заключалось в следующем. CD8+CD28- клетки были выделены из первичной

опухоли и метастатических лимфатических узлов и изучены *ин витро*. По результатам эксперимента оказалось, что CD8+CD28- клетки угнетали пролиферацию Т-клеток и тормозили их цитотоксическое действие. Также анализу был подвергнут супрессорный эффект CD8+CD28-клеток в зависимости от клинических параметров опухоли, в частности в зависимости от распространенности опухолевого процесса. Выявлено, что супрессорная активность этой популяции клеток прямо и достоверно коррелировала со стадией. Показатели выживаемости больных были значительно хуже при выраженной супрессорной активности данной популяции. Результаты указанного исследования подтверждаются и хорошо согласуются с результатами других авторов, которые анализировали CD3+, NK, CD4+CD25-клетки, CD8+клетки в крови больных раком легкого [107]. Karagoz В. и соавт. в своей работе детально изучили популяции CD8+CD28- клеток и CD4+CD25+ Т-клеток в крови при распространенном раке легкого. Авторы установили, что увеличенная доля популяции CD4+CD25+ наблюдалась у больных раком легкого по сравнению с донорами. Наравне с этим, отмечены увеличенные уровни содержания CD8+CD28- Т-клеток при немелкоклеточном раке легкого в сравнении с контрольной группой. Помимо этого, авторами установлено увеличенное соотношение CD28-/CD28+ -клеток [107].

В работе отечественных авторов изучена популяция CD8+CD28- Т-клеток при РМЖ и получены весьма любопытные данные. Содержание CD8+CD28- Т-клеток при ранних стадиях РМЖ (I-II) увеличено почти в половине случаев. Далее авторы решили изучить содержание этой популяции клеток в зависимости от лекарственного лечения. Обнаружено, что количество CD8+CD28- Т-клеток при выраженной степени патоморфоза меньше по сравнению с больными, у которых лекарственный патоморфоз был незначителен. Авторы заключают, что уменьшение доли CD8+CD28- популяции клеток коррелирует с благоприятными течением РМЖ [108].

Следующее на чем хотелось бы остановиться это популяция CD8+ CD28+Т-клеток, которая изучалась при раке легкого Liu, С. и соавт. на фоне

лекарственного лечения, а также в зависимости от морфологического вида опухоли. Исследователи сообщают, что выраженная пропорция CD8+CD28+Т-клеток коррелировала с хорошими показателями как общей выживаемости, так и выживаемости без прогрессирования, и это наблюдалось при аденокарциноме легкого, что весьма любопытно. В этом же исследовании оценена прогностическая значимость популяции CD8+CD28-Т-клеток и получены очень интригующие данные. При плоскоклеточном раке легкого выраженная доля CD8+CD28-Т-клеток достоверно коррелировала с ухудшением прогноза. Кроме того, считаем крайне важным подчеркнуть, при раке легкого CD4+CD25+ популяция Т-клеток и CD8+CD28- клеток была значительно выражена именно при аденокарциноме, тогда как доля популяций натуральных киллеров была снижена [109].

Еще больший интерес вызывает работа Liu С., которая выполнена у больных немелкоклеточным раком легкого на фоне лучевой терапии [110]. Авторы оценили прогностическое значение CD8+CD28+ клеток в процессе лечения и установили, что увеличение ее содержания может являться независимым прогностическим маркером. Иными словами, нарастание доли CD8+CD28+ клеток при немелкоклеточным раком легкого прогнозирует хороший ответ на лучевую терапию у данной категории больных [110]. Как мы видим, цитотоксическая популяция Т-клеток с экспрессией молекул CD28 ассоциируется с хорошим клиническим течением рака, тогда как отсутствие экспрессии молекулы CD28 приводит к супрессорной активности данной популяции клеток и коррелирует с ухудшением прогноза у больных, в особенности при плоскоклеточном раке. Важно подчеркнуть, что аналогичное действие наблюдали при РМЖ - уменьшение доли CD8+CD28- популяции клеток коррелировало с благоприятным течением рака [108].

Одной из приоритентных популяций цитотоксических клеток в противоопухолевом ответе является популяция НК-клеток, которая представлена CD56+CD16+ клетками. НК-клетки несут на своей поверхности

гранулы перфоринов и гранзимов, позволяющие им осуществлять цитолиз. Кроме того, они способны к идентификации на клетках липидных и гликолипидных молекул, цитокиновой и хемокиновой продукции [111]. Могут осуществлять свой ответ как эффекторы 1 или 2-го типа. В этом случае для активации им требуются разные сигналы, например интерлейкин 12. По данным многих исследований констатируется, что их процент в опухолевой ткани невелик и, видимо, они в большей степени опосредуют определенные эффекты других иммунокомпетентных клеток [112]. Можно перечислить огромный спектр биологически активных веществ, посредством которых популяция натуральных киллеров оказывает свое влияние на другие цитотоксические клетки и клетки гемопоэза в целом [113,114].

Рассмотрим ряд исследований, которые посвящены изучению функции НК-клеток. Эти данные любопытны не только с научной точки зрения, но и с клинической. Учеными установлено, что популяция натуральных киллеров может оказывать как противоопухолевое действие, так и иммуносупрессивное действие и именно в этом она проявляет свойства эффекторов 2-го типа, которые, как известно, выделяют интерлейкин 4, интерлейкин 13, интерферрон гамма [62]. Отрицательно ее действие в отношении прогноза уже установлено при меланоме кожи. Но что любопытно, противоположные результаты имели место при РМЖ [108].

Еще оно исследование привлекает внимание: это работа Ye L. и соавт., которые изучили популяции НК клеток в крови больных немелкоклеточным раком легкого с III-IV стадиями опухолевого процесса. Доля натуральных киллеров в крови больных в сравнении с группой контроль была значительно ниже, при этом наименьшая ее пропорция отмечена при IV стадии рака легкого.

Отдельно считаем необходимыми остановиться на работах, которые посвящены изучению популяций НК-клеток в костном мозге. Сразу отметим, что таких исследований насчитывается немного и результаты однозначно заслуживают внимания и тщательного изучения. Нам встретилось несколько работ по оценке содержания НК-клеток при раке молочной железы. Вот одна из

них. Авторы изучили общие уровни натуральных клеток киллеров и их субпопуляций, и установили, что при раке молочной железы в КМ увеличена доля CD56+клеток, CD56+CD69+, а также CD56+CD45RO+ клеток, что указывало на пролиферативную активность этих клеток [59].

Григорьева Т. А. и соавт. получили не менее интересные данные, заслуживающие детального рассмотрения. Авторы оценивали в КМ содержание популяций NK-клеток больных раком молочной железы и при доброкачественной патологии. Установлено, что популяция CD16+CD3– NK клеток в КМ больных РМЖ превышала количество NK клеток в КМ при доброкачественной патологии, и составила 14,9% против 8,9 %, при этом статистически значимо. В отношении субпопуляции CD56+CD3– NK-клеток столь достоверных различий авторы не наблюдали, но это несколько не умаляет значимость и интерес работы [102]. Довольно подробный анализ выполняли другие авторы, которые при РМЖ оценили NK-клетки в КМ в зависимости от подтипа и морфологических особенностей РМЖ. [103]. Показано, что уровни CD16+CD3- и CD56+CD3- NK-клеток преобладают у больных РМЖ с низким индексом пролиферативной активности [103].

Перейдем теперь к популяции В клеток. Это популяция также разнообразна и обладает различными свойствами, как проопухолевыми, так и противоопухолевыми. Процент этих клеток составляет порядка 5-15% от всех лимфоцитов. Значимую роль в противоопухолевом иммунитете отводится преимущественно зрелым В1- клеточным популяциям. По последним научным данным известно, что именно В1- клетки производят более половины иммуноглобулина М, важная роль которого в апоптозе опухолевых клеток хорошо известна. Это происходит благодаря распознаванию особых углеводных структур на поверхности клетки – гликанов, а затем перемещению липидов в клетки и тем самым гибели клетки, по сути, от ожирения [115].

Популяция В1-клеток несет на себе отличительный маркер, который может встречаться и на Т-клетках, это CD5. Именно CD19+CD5+ субпопуляция относится к врожденному иммунитету и гарантирует программу

антителопродукции иммуноглобулинов М. В своем труде Григорьевой Т. А. и соавт. анализировали популяции В1- лимфоцитов в КМ при РМЖ и получили много интересных данных в их отношении, в частности при сравнении рака и доброкачественной патологии [102]. Также эти исследователи обнаружили связи В-клеток с гистологическим подвариантом опухоли. Оказалось, что при инфильтративно-протоковой аденокарциноме молочной железы костномозговые популяции В- клеток преобладали, а именно, было отмечено достоверное увеличение доли предшественников В-клеток [102].

Популяция В1- клеток детально изучалась при РМЖ и другими авторами. В работе освещены очень важные аспекты касающиеся связи В-лимфоидных популяций врожденного иммунитета в КМ с биологическими подтипами РМЖ. Так, Мкртчян В.А. и соавт. обнаружили, что при люминальном подтипе РМЖ уровни содержания В1- клеток могут различаться, в частности, анализ касался люминального В Her2-позитивного подтипа и Her2 негативного подтипа [119]. Количество В1-лимфоцитов в КМ оказалось достоверно больше при Her2-позитивном подтипе люминального РМЖ ($p = 0,032$). Как мы уже упоминали, это довольно важный факт и привлекает наше внимание, поскольку именно эта популяция клеток отличается продукцией выраженного количества антитела класса М. Эти пентамерные антитела класса М обладают способностью распознавать гликаны (углеводные детерминанты) на опухолевых клетках и специфически их связывать, тем самым приводя к апоптозу, то есть, вызывая транспортировку липидов в клетки опухоли, приводить к ее гибели [115].

Помимо этого, авторами выявлены крайне интересные данные в отношении доброкачественных процессов в молочной железе в сравнении с РМЖ. Так, установлено, что отсутствует обратная корреляция CD5+ В-клеток с процентным содержанием в КМ моноцитов при РМЖ, что наблюдали статистически значимо при доброкачественной патологии молочной железы [119]. Наравне с этим авторы демонстрируют, что при РМЖ имеет место выраженная пропорция В1-лимфоидных популяций в КМ и их связь с уровнем плазматических клеток. Такая связь В1-лимфоцитов с плазматическими клетками отмечена именно при раке, но

не наблюдалась при доброкачественных процессах в молочной железе. Эти результаты указывают на определенные изменения в лимфопоэзе в КМ при злокачественном процессе и, возможно, регуляторном взаимовлиянии этих клеток, включая и моноцитарное звено. Такая связь не описана ранее, и нами в доступной литературе не встречалась, поэтому мы сочли необходимым более детально рассмотреть еще работу Крохиной О.В. В данном исследовании было обнаружено, что накопление плазмочитов в КМ возникало при метастатическом поражении КМ клетками РМЖ, и это было установлено в большинстве случаев в данном исследовании [120]. Интересная закономерность. По всей вероятности, это может служить признаком распространенности опухоли и, в частности, метастатического поражения КМ опухолевыми клетками.

Есть еще одно наблюдение, которое приковало наше внимание в описанной выше работе по изучению врожденного звена иммунитета. Это выявленная авторами связь ТСР $\gamma\delta$ -клеток и В1 -клеток, которая заключалась в высокой прямой корреляции [119]. Такого рода связь наблюдалась при доброкачественной патологии, но не была зарегистрирована при РМЖ, что не может не обратить внимание исследователей. Возможно, в этом кроется расшифровка определенного рода взаимоотношений клеток врожденного иммунного ответа и это в дальнейшем может помочь в принятии решений о тактике ведения таких пациентов, у которых выявляется подобного рода нарушение во взаимовлиянии ТСР $\gamma\delta$ - клеток и В1-лимфоцитов.

Дополнительно считаем важным привести исследования, в которых также освещается роль лимфоидных популяций КМ, но при опухолях гемопоетической природы. Согласно работе Колбацкой О.П., имеются специфические изменения состава субпопуляций лимфоцитов при разных формах острых лейкозов [121]. Приводятся данные о существовании различий в составе лимфоидных популяций КМ при остром миелоидный лейкозе и острый лимфобластном лейкозе, и эти различия касались содержания эффекторных Т-клеток. Кроме этого, автором указывается на наличие связи эффекторных Т-клеток с морфоцитохимическими повариантами острого миелоидного лейкоза, а также этих популяций с

иммунофенотипическим типом острого лимфобластного лейкоза и в зависимости от иммунофенотипа бластных клеток [121]. Эти данные однозначно подчеркивают, что субпопуляционный состав лимфоцитов претерпевает значительные изменения при различных онкопатологиях.

Остановимся на исследовании CD27+CD38+/- В-клеток, а также плазматических клеток, несущих маркер клеток памяти CD27+. Исследование этих клеток проведено в опухоли, в крови при раке легкого. Результаты были довольно неожиданными и безусловно любопытными. Так, выраженный уровень В-клеточной инфильтрации был выявлен при раке по сравнению с неопухолевой тканью. Самое интересное, что этот выраженный процент В-клеток в опухоли был независимо от гистотипа рака легкого, то есть, и при аденокарциноме ($p < 0,0001$), и при плоскоклеточном раке ($p = 0,007$). Анализируя собственные результаты, авторы пришли к выводу, что именно пропорция плазматических клеток CD27+CD38+/- являлась причиной выраженной доли В-клеток в опухоли, поскольку количество другой популяции плазматических В-клеток CD27+CD38++ было сопоставимо в опухоли и в неопухолевой ткани. Дополнительно отметим, что при плоскоклеточном раке доля субпопуляции IgM+IgD- В-клеток была больше [100].

Banat G.A. и его группа также отметила увеличение доли В-клеточной инфильтрации в опухоли при раке легкого при противопоставлении с нормой [87]. Кроме того, необходимо указать, что авторы выявили корреляцию распространенности опухоли и выраженности В-клеточной инфильтрации. Доля CD20+клеток была существенно выше при стадии III по сравнению со I стадией рака, составив 75% и 9%, соответственно. Однако, не было связи с размером опухолевого узла, гистологическим вариантом. При этом имела место более выраженная инфильтрация CD20+В- клетками при отсутствии метастазов в лимфатических узлах [116]. Аналогичные последним данные в своей работе описывает Григорьева Т.А., но при РМЖ. Этот факт свидетельствует о реализации гуморального звена (В-клеточного) ответа уже на ранних стадиях, когда диссеминация в лимфатических узлах еще отсутствует.

Как можно видеть, состав лимфоцитов изучается довольно широко при раке. Исследования касаются как популяций лимфоцитов периферической крови, так и опухолефильных популяций клеток. Все больше фокуса в последнее время смещается на анализ лимфоцитарных популяций в КМ, что трансформирует понимание о принципах взаимодействия опухоли и иммунной системы больного. Через эти исследования мы узнаем совершенно новые аспекты иммунного ответа на опухоль, которые являют нам неоднозначный характер этих взаимодействий.

Обратим внимание, что по данным целого ряда научных работ становится ясно, что крайне важно изучение состава лимфоидных популяций при метастатическом поражении КМ. Немало накоплено данных, которые демонстрируют, что именно костномозговые популяции клеток могут играть важную роль в реализации противоопухолевой защиты [117]. Мы уже указывали исследования, в которых проводили сравнение уровня лимфоидных популяций при раке со здоровыми донорами. Так вот, имеются работы, которые освещают особенности лимфоидных популяций при метастазах в КМ (диссеминированных опухолевых клеток - ДОК).

Признаться, это небезынтересно, и мы решили остановиться на рассмотрении этих работ. Показано, что в случаях поражения КМ количество клеток субпопуляций CD4+, CD8+, CD56+ более выражено [59]. В другом исследовании описаны иные результаты: снижении доли CD8+клеток [77]. В этой работе изучен КМ больных РМЖ и установлено, что доля CD8+ клеток при метастазах РМЖ в КМ была достоверно ниже и составила 39,2% против 48,1%. Это позволяет предположить, что, возможно, персистенция клеток рака в КМ определяется именно состоянием костномозгового микроокружения.

Любопытные данные получены Джуманазаровым Т.М., в работе которого детально изучались костномозговые популяции у больных немелкоклеточным раком легкого [95]. Им установлены очень интересные закономерности. Авторы выполнили оценку субпопуляций Т- лимфоцитов -(CD3, CD4, CD8), зрелых В-

лимфоцитов (CD20), NK-клеток, а также таких субпопуляций как CD4⁺CD25⁺⁺, клеток памяти CD27, перфорин- содержащих.

В самом начале работы авторы обнаружили выраженные различия в составе лимфоцитов КМ больных плоскоклеточным раком и аденокарциномой. Для плоскоклеточного рака легкого в сравнении с аденокарциномой характерными оказались показатели зрело-Т-клеточного иммунитета и повышение уровней цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов (Т-клетки и NK-клетки) [95]. Напротив, для аденокарциномы легкого отмечена увеличенная доля зрелых В-лимфоцитов (CD20⁺CD45⁺⁺), клеточной составляющей гуморального иммунитета. В последующем более детальный анализ состава КМ лимфоцитов при раке легкого подтвердил это. Авторы изучили эффекторные субпопуляции, действие на которые могло бы иметь пользу для усиления эффективности противоопухолевого иммунного ответа. Показана связь этих эффекторных субпопуляций с гистологическим типом рака легкого. Доля цитотоксических CD4⁺клеток и CD27⁺клеток, содержащих перфорин, была более выражена при аденокарциноме легкого.

CD4-популяция клеток, которая во многом обуславливает помощь в реализации гуморального ответа (например, секретирова интерлейкины) выступила с новым свойством. Она была более выражена при аденокарциноме легкого, проявляя себя с другой стороны – цитотоксического потенциала. Данная популяция клеток хорошо известна, но ее роль при раке легкого пока неясна и данные результаты были совершенно неожиданны в особенности потому, что в КМ субпопуляционный состав лимфоцитов пока слабо изучен при раке и любые закономерности требуют тщательного анализа [118]. Итак, вернемся к гистотипу рака легкого: Т-клетки CD3⁺ и CD8⁺ достоверно были более выражены при плоскоклеточном раке, тогда как В-клетки были характерны для аденокарциномы. Здесь авторы предполагают, что эти данные в будущем могли бы позволить в зависимости от характера иммунного ответа (Т-, NK-клеточного или гуморального) при разных гистологических вариантах рака легкого более

прицельно планировать иммуноориентированную терапию, а возможно, и таргетную.

Цитотоксические популяции CD4⁺ Т-клеток участвуют в различных реакциях иммунного ответа, составляя существенную роль в борьбе с вирусами, и злокачественными опухолями. Они наделены возможностью секретировать гранзимы и перфорины и осуществлять киллинг опухолевых клеток в контексте связывания с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса. По последним данным, они наиболее похожи на Т-хелперы 1-го типа, способны к продукции интерферона- γ . Также отметим, что по результатам научных исследований сообщается о подклассе наивных Т-клеток, которые могут дифференцироваться в цитотоксические CD4⁺-клетки и поэтому они могли бы быть мишенями для лекарственной терапии [118].

Напомним, что для активации Т-лимфоцита необходимо взаимодействие Т-клеточного рецептора с пептидом, в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости, а также принятие коstimуляторного сигнала от дополнительных не Т-клеток. Одним из таких сигналов является рецептор CD28, коstimуляция которого необходима. Также есть рецептор CD27, который также является коstimуляторным и представляет собой трансмембранный гомодимер. Известно, что гликопротеин CD27 находится на поверхности медуллярных тимоцитов, Т-лимфоцитов крови, зрелых В-клетках и натуральных клеток киллеров. Он экспрессируется и эффекторными и регуляторными Т-клетками при раке и других патологиях. Разработано и апробируется в ряде исследований антитело – агонист CD27 (варлилумаб), которое себя положительно зарекомендовало при начальном этапе исследований у человека, показав, что является клинически эффективным препаратом и приводит к достаточно выраженным ответам на лечение [96].

Таким образом, представленные данные, накопленные в последние годы по данному вопросу, свидетельствуют о центральной роли костного мозга в становлении противоопухолевого иммунитета, наличии особенностей иммунных клеток костного мозга в зависимости от вида опухоли и ее различных вариантов.

Доказано существование связи субпопуляционного состава лимфоцитов с клиническими особенностями и прогнозом рака. Следовательно, оценка роли субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга в долгосрочном прогнозе рака молочной железы является перспективным направлением исследований, которое может вести к более точному пониманию показаний и противопоказаний к иммунотерапии, а также к совершенствованию комплексного обследования больных, включая исследование субпопуляционного состава лимфоцитов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика больных раком молочной железы

Данная работа основана на анализе комплексного обследования и лечения 107 больных раком молочной железы, проходивших лечение в отделении опухолей молочных желез в основном в период 2013-2016 гг. (2013 – 32 больных, 2014 – 19, 2015 – 28, 2016 – 18), единичные больные обследованы в более ранние и более поздние сроки: 1990 – 1, 2001 – 1, 2003 -1, 2008 – 1, 2012 -1, 2018 -1. Таким образом, длительность периода наблюдения за пациентами после оперативного лечения в основном составила от 5 до 8 лет. Возраст больных варьировал от 33 до 74 лет (средний возраст $54,9 \pm 9,8$ лет, медиана 53 года, (Таблица 1).

Таблица 1- Распределение пациентов в зависимости возраста

Возраст	N	%
30-39	9	8,4
40-49	22	20,5
50-59	37	34,5
60-69	31	29,0
70 и старше	8	7,5
Средний возраст	54,9±9,8 лет	

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288). Костный мозг для данного исследования получен методом стерильной пункции. Исследование

субпопуляций лимфоцитов костного мозга проводили только у тех больных, не получавших лучевую, полихимиотерапию или гормонотерапию.

Все случаи РМЖ классифицированы клинически по системе TNM в соответствии с требованиями Международного противоракового общества (UICC, версия 2002г.) и описаны гистологически на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в отделении патоморфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина. Стадирование заболевания выполнено в послеоперационном периоде после получения ответа планового гистологического исследования. (Таблица 2).

Таблица 2 - Распределение больных по стадиям и гистологическим характеристикам

Клинико-гистологические характеристики	N	%
Гистологический тип		
Инфильтративно-протоковый рак	76	71,0%
Инфильтративно-дольковый рак	15	14,0%
Смешанный рак	7	6,6%
Редкие формы	7	6,6%
In situ	2	1,8%
Стадии заболевания		
In situ	2	1,9
I	38	35,5
IIa	48	44,9
IIб	19	17,8

Степень дифференцировки опухоли		
G1	23	21,5
G2	67	62,7
G3	17	15,8
Метастазы в лимфатических узлах		
N0	75	70,1
N1	32	29,9

Иммуногистохимические исследования проведены в отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России на серийных депарафинизированных срезах опухолевой ткани с помощью биотин-стрептавидинового иммунопероксидазного метода с антителами к рецепторам эстрогенов (ER α), прогестерона (PR), рецептору эпидермального фактора роста 2 типа (HER2) и Ki-67.

Ниже представлены результаты исследований рецепторного статуса, экспрессии Her2/neu, уровней пролиферативной активности (Ki-67) (Таблица 3).

Таблица 3 - Данные по экспрессии Her2/neu, рецепторному статусу, уровням пролиферативной активности (Ki-67)

Показатель	N	%
ER -отр. (до 3 баллов)	25	23,4
ER-положительно	82	76,6
Итого	107	100
PR-отр.(до 3 баллов)	35	32,7
PR-положительно	72	67,3
Итого	107	100

Продолжение таблицы 3

Her2neu.ball		
0/1+	54	50,5
2+	37	34,6
3+	16	15,0
Итого	107	100
К67		
низкая (до 20%)	32	29,9
высокая (20% и более)	75	70,1
Итого	107	100

Молекулярно-биологические подтипы РМЖ выделяли по следующим

критериям: Люминальный А:

- позитивный статус РЭ и РП (≥ 6 по Allred);
- экспрессия Her2/neu - 0-1+;
- низкая (G1) степень злокачественности;
- Ki-67 менее 20%.

Люминальный В (Her2-негативный):

- позитивный статус РЭ и/или РП (≤ 5 по Allred или отрицательный);
- умеренная (G 2) и высокая степень (G 3) злокачественности;
- Ki-67 более 20%.

Люминальный В (Her2-позитивный):

- позитивный статус РЭ и/или РП;
- Her2 (3+);
- Ki-67 более 20%.

Нелюминальный Her2/neu -позитивный:

- Her2 (3+) или амплификация Her2/neu (FISH);

– отсутствие экспрессии рецепторов стероидных гормонов.

– Ki-67 любое

Трижды-негативный:

– отсутствие экспрессии рецепторов стероидных гормонов;

– отсутствие экспрессии Her2/neu (<2+).

– Ki-67 любое

По молекулярно-биологическому подтипу рака молочной железы в большинстве случаев были представлены люминальным В Her2/neu-негативный, трижды-негативный диагностирован всего лишь у 12% больных (Рисунок 1).

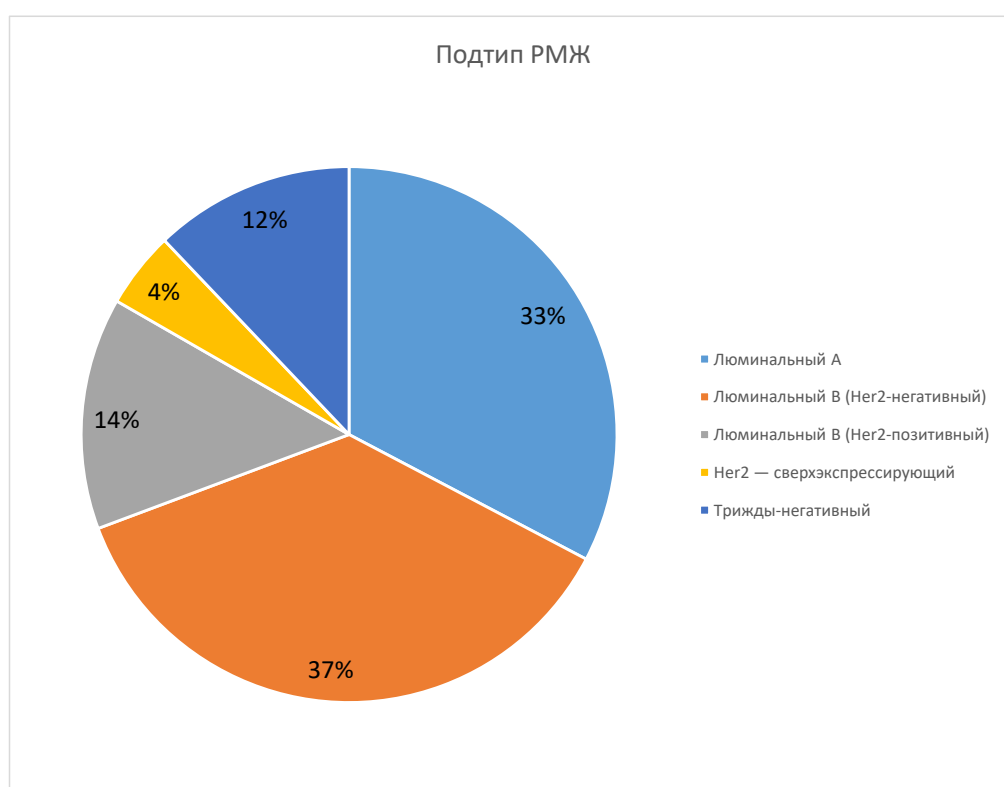


Рисунок 1 – Распределение больных в зависимости от молекулярного подтипа рака молочной железы

2.2 Виды и объем лечения больных раком молочной железы, включенных в исследование

На первом этапе пациентам было проведено хирургическое лечение. Выбор

метода лечения зависел от стадии заболевания, генетического статуса и предпочтений пациентки. Радикальная резекция молочной железы выполнена 41(38,3%) пациенткам, мастэктомии с сохранением грудных мышц – 66 (59,7%). (Рисунок 2). Хирургическое вмешательство носило исключительно радикальный характер.

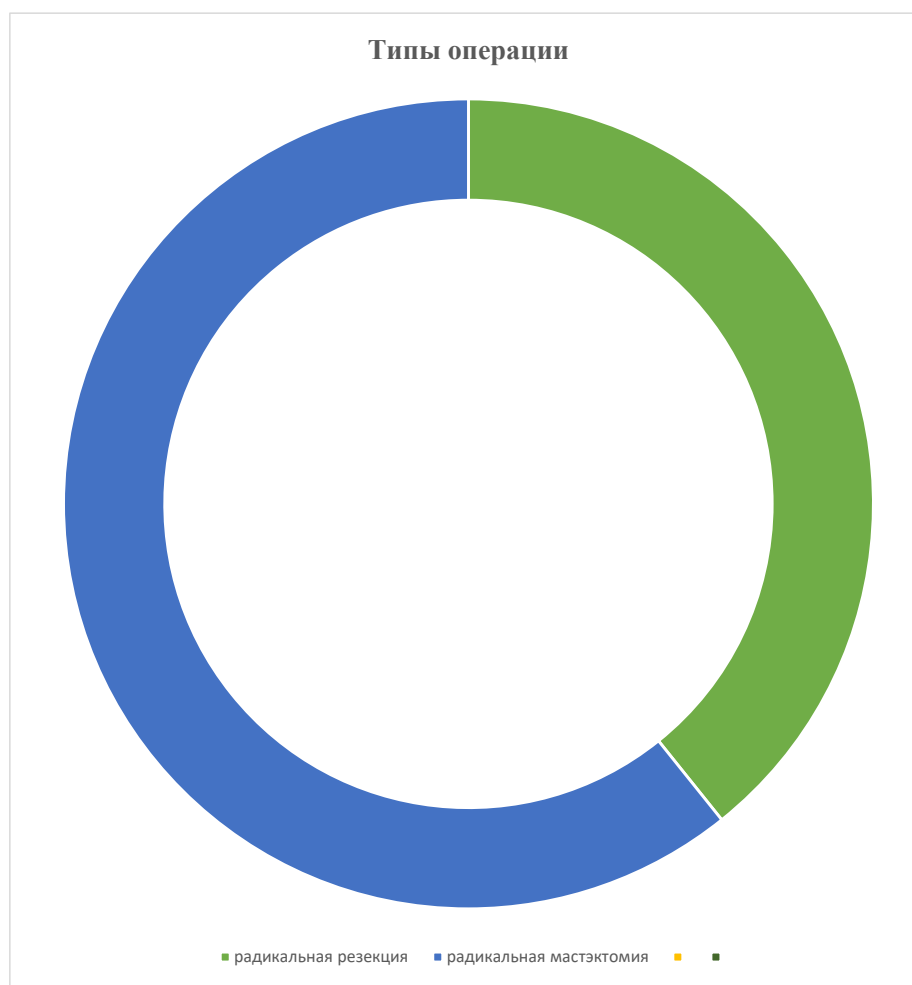


Рисунок 2 – Распределение больных в зависимости от метода хирургического лечения

В адьювантом режиме 70 (65,4%) пациентам была назначена химиотерапия: использовались схемы: АС – у 24 (22,4%) из 70 пациентов, АС + Таксаны – у 19 (17,7%), 4АТ- у 5(4,6%). Пациенты с Her2(+) положительным статусом получали таргетную анти-Her2-терапию. Трастузумаб 8мг /кг 1 нагрузочная доза и далее 6 мг/кг каждые 3недели до года. Лучевая терапия в дозе 45-50 Гр – проведена 49 (45,8пациентам. Гормонотерапия препаратами

Тамоксифен, Анастрозол и Летрозол назначена 90 (84%) пациентам (Таблица 4).

Таблица 4 - Типы операции, проведение лучевой, химио- или гормонотерапии

Вид лечения	Частота	Процент
Хирургическое лечение		
радикальная резекция	41	38,3
радикальная мастэктомия	66	61,6
итого	107	100
Лучевая терапия		
не проводилось	58	54,2
проводилось	49	45,8
итого	107	100,0
Химиотерапия		
Не проводилась	37	34,6
4АС	24	22,4
12 введений паклитаксел + трастузумаб	7	6,5
4АС +трастузумаб +паклитаксел	12	11,2
4АС+4Таксаны	19	17,7
4 АТ	5	4,6
6 Капецитабин	3	2,8
Доцетаксел+карбоплатин		
Итого	107	100,0
Гормонотерапия		
Не проводилась	17	15,8
Антиэстрогены	49	45,8
Ингибиторы ароматазы	41	38,0
Итого	107	100,0

2.3 Методы исследования

Иммуногистохимическое исследование выполнено в отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Материалом для нашего исследования являлись образцы первичной опухоли больных РМЖ, которые были получены после хирургического вмешательства. Поскольку период исследования составил большой промежуток времени, для адекватного стадирования и уточнения гистотипа РМЖ потребовалось пересмотреть гистологические препараты, включенных в исследование больных. Это было выполнено в соответствии с требованиями оценки распространенности опухоли, а также наличия митотической активности, согласно классификации ВОЗ 2012 г [123].

Определение степени злокачественности РМЖ выполнено согласно Nottingham Histologic Score [123].

Для уточнения рецепторного статуса РМЖ применяли методику иммуногистохимического окрашивания. Для этой цели с помощью микротомы подготавливали срезы с парафиновых блоков, толщиной 4-5 мм, которые затем помещались на предметные стекла и высушиваются. Далее осуществляли депарафинирование/регидратацию в строгом соответствии со стандартной процедурой (ксилол, этанол (100%, 96%, 80%), вода дистиллированная), поскольку остатки парафина могут исказить результат гистохимической реакции. Для демаскировки антигенной структуры опухолевых клеток выполняли нагревание на водяной бане при цитратном буфере, рН 6,0. Затем в течение 30 мин выполнялась инкубация с первичными антителами во влажной камере. Далее антитела отмывали, наносили вторичные антитела и также инкубировали 30 мин. После отмывания срезы инкубировали со стрептавидином (связанный с пероксидазой) 30 мин и отмывали в буферном растворе. После реакции с диаминобензидином (5 мин) снова срезы отмывались и докрашивались гематоксилином Майера. Завершали реакцию дегидратацией и заключением срезов в канадский бальзам.

Далее врачами патоморфологами выполнялась световая микроскопия готовых препаратов и оценивались экспрессия рецепторов эстрогенов, экспрессия рецепторов к прогестерону, экспрессия рецепторов к Her2/neu, а также ядерного белка Ki67 клетками опухоли (Таблица 5).

Таблица 5 – Моноклональные антитела для оценки рецепторного статуса клеток рака молочной железы

Моноклональное антитело/клон	Производитель
Progesteron Receptor/ SP42	Cell Marque (США)
Estrogen Receptor/ SP1	Cell Marque (США)
Her2/Herceptest	Dako (Дания)
Ki-67/ MiB-1	Dako (Дания)

Оценка экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону выполнялась по методу Allred в баллах. Учитывали интенсивность окраски ядер (IS) и количество антиген-позитивных клеток (PS), а затем подсчитывали общий балл (TS = IS + PS).

При отсутствии реакции выставлялось 0 баллов. Далее, при бледно-коричневом цвете ядер – 1 балл; умеренно насыщенном коричневом однородном цвете (или неоднородный от бледного до насыщенного) – 2 балла. Если ядра имели темно-коричневый цвет однородного характера, то выставлялось 3 балла.

Подсчитывали количество антиген-позитивных клеток и присваивали число баллов согласно следующей градации:

- 1 – менее 1% позитивных клеток;
- 2 – не более 10% позитивных клеток;
- 3 – 33% - 11% позитивных клеток;
- 4 – от 34 до 66% позитивных клеток и 5 – все клетки позитивны или не менее 67%.

Учет результатов: негативный: 0-1 балл; позитивный: 3 и более балла.

Позитивный контроль: слабо и/или умеренно позитивные гетерогенной окрашенные клетки долек и протоков молочной железы.

Иммуногистохимическая реакция для оценки экспрессии рецепторов Her2 учитывалась на основании новых рекомендаций «ASCO»/CAP от 2013 года. Оценка мембранного окрашивания опухолевых клеток выполнялось также полуколичественным методом, по результатам которой присваивалось от 0 до 3 баллов. Положительным контролем служило мембранное окрашивание слабой степени выраженности люминальных клеток протоков молочной железы. Учет реакции окрашивания по оценке экспрессии рецепторов Her2 клетками РМЖ приведен ниже:

- 1) Негативный статус (0 или 1+): слабое/отсутствие (менее 10% опухолевых клеток).
- 2) Неопределенный статус (2+): умеренное/сильное (10% - 30% опухолевых клеток) или сильное мембранное окрашивание (менее 30% опухолевых клеток).
- 3) Позитивный статус (3+): сильное полное (более 30% опухолевых клеток).

При учете экспрессии ядерного белка Ki-67 в клетках РМЖ принимали во внимание любой тип экспрессии и интенсивности окрашивания ядер. Пороговым значением являлось >20% антигенпозитивных клеток.

2.3.1 Морфологическое исследование костного мозга

Костный мозг больных РМЖ получали во время оперативного вмешательства: выполнялась пункция грудины. Перед данной процедурой пациентки подписывали дополнительное добровольное согласие на получение костного мозга и последующего иммуноморфологического исследования (лаборатория иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, руководитель – профессор, д.м.н. Н.Н. Тупицын) [126]. Для морфологического исследования, в первую очередь, выполняли просмотр препаратов на предмет исключения опухолевых клеток в костном мозге. Затем проводили подсчет общего количества миелокариоцитов на приборе

(Micros 60, Horiba, USA). После приготовления и фиксации (по Май-Грюнвальду) мазков костного мозга их окрашивали по методу Романовского. (в 47 мл дистиллированной воды добавляли 1 мл готовой жидкой краски и 5,8-6,0 мл буферного раствора). Препараты высушивали и проводили световую микроскопию (микроскоп ZEISS, AXIOSKOP, Германия). Подсчет морфологически выявляемых клеточных типов осуществляли два морфолога на 500 клеток. Оценивались все ростки кроветворения. В пределах гранулоцитарного ростка и эритроидного ростка учитывались как предшественники, так и созревающие клеточные типы, а также выполнялись расчеты индексов миелограмм (индекс созревания нейтрофилов, индекс созревания эритроцитов, лейко-эритробластическое соотношение). Для статистической обработки оставлены образцы костного мозга, в которых исключено разбавление периферической кровью.

2.3.2 Иммунофенотипирование лимфоцитов костного мозга

Как было указано выше получение костного мозга больных РМЖ проводилось строго после подписания добровольного согласия на данную процедуру и дальнейшее исследование. Исследование лимфоцитов костного мозга выполнялось путем иммунофлуоресцентного окрашивания с применением моноклональных антител, которые представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Панель моноклональных антител

№	Антитела/флуорохромы							
	PerCPC y7	APC	V500	FITC	PE	PerCP -Cy5	V450	APC- H7
1	CD5	CD3	CD45	CD20	CD95	CD27	CD4	CD19
2	CD5	CD3	CD45	CD22	CD38	CD27		CD19
3	TCR $\gamma\delta$	CD5	CD45	CD4	CD25	CD3	CD2	CD8
4	CD56	CD94	CD45	CD16	CD45RO	CD3	CD2	CD8

Продолжение таблицы 6

5	CD56	CD94	CD45	CD16	HLA-DR	CD3	CD2	CD8
6	CD56	CD94	CD45	CD16	CD7	CD3	CD2	CD8
7	CD56	CD94	CD45	Perforin	Granzym	CD3		
8	CD56	CD94	CD45	CD57	CD26	CD3		

Первым этапом выполнялась пробоподготовка. Пробирку с костным мозгом разбавляли буферным раствором и центрифугировали в течение 5 мин.

Супернатант удаляли и приступали к лизированию примеси эритроцитов. Инкубация с лизирующим раствором продолжалась не более 10 мин, после чего проводили отмывку раствором PbS. При необходимости процедуру повторяли. Полученную отмывую клеточную суспензию в соответствии с панелью антител раскапывали в пробирки и добавляли антитела. Инкубация продолжалась в течение 30 мин. После это клетки отмывали путем центрифугирования с раствором PbS и собирали на проточном цитометре. В тех пробирках, в которых предусмотрена оценка экспрессии перфоринов и гранзимов, проводилась реакция пермеабиллизации.

После сбора клеток на цитометре FACSCanto II выполнялся анализ экспрессии антигенов на лимфоцитах в программе FCS3. Количество оцениваемых событий составило: 100 000-200 000. Гейтирование выполняли по панлейкоцитарному маркеру CD45+ против SSC - параметра бокового светорассеяния лазерного луча. Оценивали Т-, В-, NK – клеточные популяции. Также проводили анализ в пределах гейта зрелых В-клеток, а также в пределах гейта зрелых Т-лимфоцитов.

На рисунке 3 представлен анализ лимфоцитарных популяций КМ по нескольким Т-клеточным маркерам. Сначала выполняется выделение популяции CD45+ клеток, затем, в пределах данного гейта, оценивает количество зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), цитотоксических Т-клеток (CD8+) (Рисунок 3).

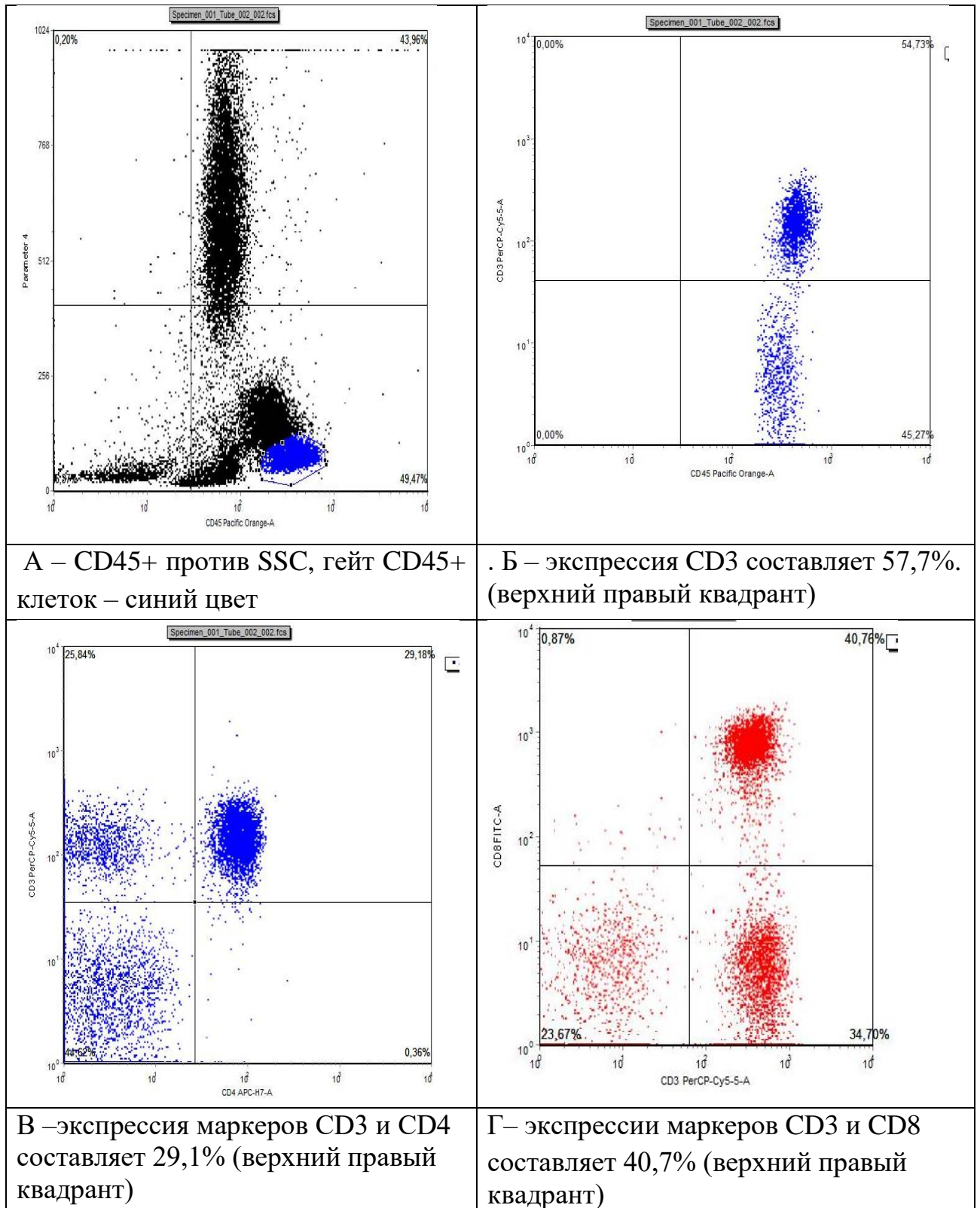


Рисунок 3 – Экспрессия маркеров в пределах популяции CD45+лимфоцитов

2.4 Статистическая обработка

Для статистической обработки результатов данного исследования указанные данные 107 больных РМЖ формализованы при помощи специально разработанного кодификатора и внесены в «базу данных», созданную на основе электронных таблиц EXCEL v. 2010 г. Полученные результаты обработаны стандартными пакетами STATISTICA, v. 10 и IBM SPSS Statistics, v. 21.

Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию t Стьюдента для нормально распределенных величин. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и χ^2 (Хи-квадрат). Различия считали значимыми при $p < 0,05$ (точность $\geq 95\%$), также использовалась маргинальная значимость ($0,05 < p < 0,1$) для обозначения тенденции. Показатели выживаемости рассчитали по методу Каплана-Майера. Различия выживаемости в группах определили по log-rank test, а также тестам Бреслоу, Тарон-Уоре. Оценили общую выживаемость пациентов, выживаемость без признаков прогрессирования РМЖ, а также бессобытийную, безметастатическую и безрецидивную выживаемости. В качестве пороговых значений при анализе выживаемости использовали следующие уровни костномозговых лимфоцитов: CD19 – 10%, CD19+CD10+ - 12%, CD19+CD38+ -10%, CD19+CD5+ - 10%, CD4+ - 30%, CD8+ - 30%, CD3+ - 60%, CD8+HLA-DR+ - 10%.

Использованы результаты корреляционного, однофакторного регрессионного анализа. Время до прогрессирования рассчитывалось от даты установления диагноза до даты прогрессирования/смерти, либо даты последнего контакта с пациенткой. Продолжительность жизни рассчитывалась от даты установления данного диагноза до даты последнего контакта/смерти. Для выбывших из-под наблюдения пациентов указанный показатель оценивался исключительно по дате последнего визита.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе данного исследования у больных раком молочной железы были выбраны показатели общей выживаемости, выживаемость без прогрессирования, а также уровень показателей локорегионарного контроля и отдаленного метастазирования.

Общая выживаемость (ОВ) определялась длительностью наблюдения от даты начала лечения до смерти пациентки/даты последнего обращения. Выживаемость высчитывалась по состоянию на март 2021г. Выживаемость без прогрессирования/уровень локорегионарного контроля и отдаленного метастазирования – с даты начала лечения и возникновения рецидива и/или метастаза. При расчете риска развития локальных рецидивов учитывались только локальные/ локорегионарные/ регионарные рецидивы, т.е. не учитывались смерти от других причин (умершие в этом случае цензурировались) и смерти от прогрессирования без локальных рецидивов. Случаи смертей от других причин и от прогрессирования без локальных рецидивов цензурировались по длительности наблюдения до смерти. В связи с этим выживаемость без локорегионарного рецидива выше общей выживаемости.

3.1 Факторы прогноза при раке молочной железы

Факторы прогноза заболевания при раке молочной железы хорошо известны, на них во многом базируется диагностика молекулярных типов заболевания и выбор тактики лечения, дополняющего хирургическое, - гормонального, химиотерапии, лучевой и таргетной терапии.

К числу прогностических факторов относят как клинические (размер опухоли, наличие метастазов в регионарные лимфатические узлы и отдаленных метастазов, стадия заболевания), патоморфологические (гистологический вариант, индекс пролиферации), рецепторный статус (рецепторы эстрогенов, прогестерона, Her2/neu) и, конечно же, молекулярный вариант заболевания.

3.1.1 Клинические факторы прогноза

Размер опухоли

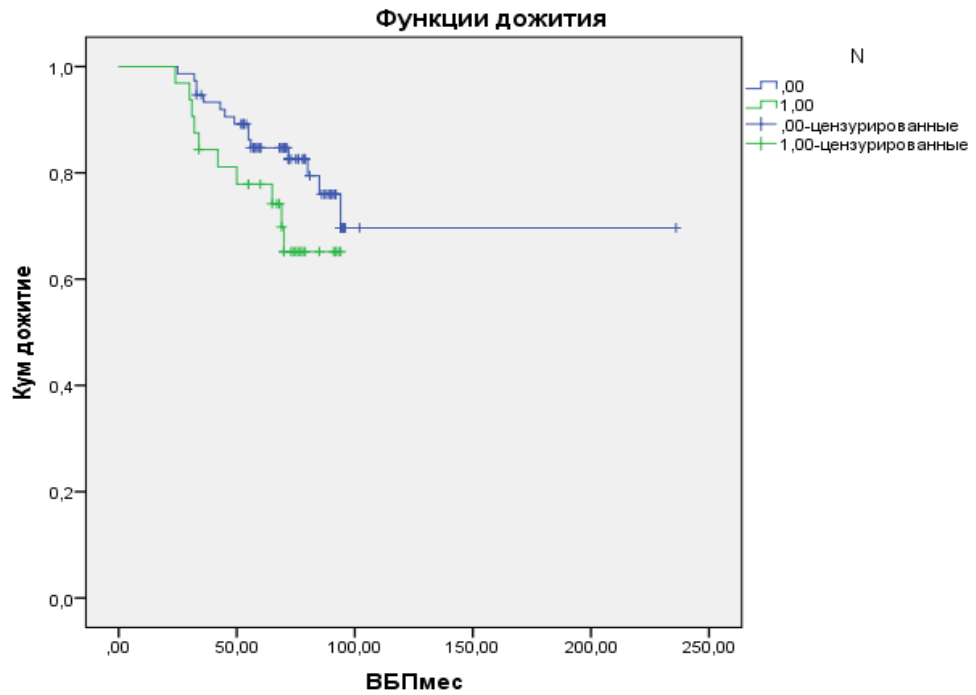
Сравнили показатели общей выживаемости, безрецидивной выживаемости, выживаемости без прогрессирования и безметастатической выживаемости при опухолях различного размера у 107 больных, включенных в исследование.

Поскольку группы больных раком *in situ* (2 больных) и с размером опухоли T3 (3 больных) были крайне малочисленны, они были исключены из анализа. Таким образом, анализ был проведен у 102 больных: T1 – 54, T2 – 48. Различий в прогнозе (общей выживаемости) между этими группами не выявлено, $p=0,897$. Не было также различий в безрецидивной выживаемости (БРВ) – $p=0,955$; выживаемости без прогрессирования (ВБП) – $p=0,4$ и безметастатической выживаемости (ВБМ) – $p=0,375$.

Поражение лимфатических узлов

В анализируемой группе у 75 пациенток поражение лимфатических узлов отсутствовало (N0), а у 32 – соответствовало индексу N1.

Разницы между группами не было в ОВ ($p=0,324$), БРВ ($p=0,322$) и ВБМ ($p=0,247$). Вместе с тем, выживаемость без прогрессирования у больных с индексом N1 была более низкой в сравнении с группой больных с индексом N0: лог-ранк тест – $p=0,112$; Бреслоу – $p=0,086$; Тарон-Уоре – $p=0,091$ (Рисунок 4).

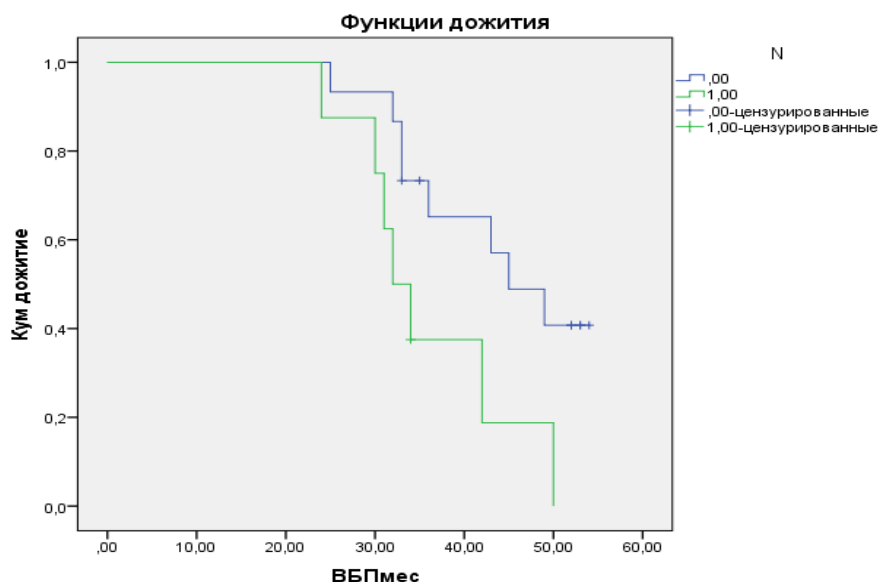


Кривая синего цвета – N0, кривая зеленого цвета – N1

Рисунок 4 – Кривые выживаемости без прогрессирования по Каплан-Майер в зависимости от наличия метастазов в регионарные лимфатические узлы

Следовательно, факт поражения регионарных лимфатических узлов при раке молочной железы играет определенную роль в прогнозе заболевания и прогрессирование в случаях наличия метастазов наблюдается чаще, чем в случаях отсутствия таковых. Это наблюдается в сроки 2-5 лет после операции.

Если проанализировать группу больных, наблюдавшихся менее 55 мес., то различия в выживаемости достоверны ($p=0,029$), следует отметить, однако, что в группе N0 было всего лишь 15 пациенток, а в группе N1 -8 (Рисунок 5).



Кривая синего цвета – N0, зеленого – N1

Рисунок 5 – Кривые выживаемости без прогрессирования по Каплан-Майер в зависимости от поражения регионарных лимфатических узлов при сроках наблюдения менее 55 мес.

Стадия заболевания

Из анализа была исключена малочисленная группа (2 больных с раком *in situ*). Таким образом, распределение по стадиям было следующим: 1 стадия – 38 больных, 2a – 48, 2b – 19.

Ни по одному из критериев выживаемости (ОВ, БРВ, ВБП, ВБМ) не отмечено достоверных различий между стадиями, p в диапазоне от 0,335 до 0,848.

Гистологический тип опухоли

Сравнительный анализ выживаемости проведен между группами инфильтративного протокового рака (75 больных) и инфильтративного долькового рака (17 больных), редкие формы были исключены из анализа.

Ни по одному из критериев выживаемости (ОВ, БРВ, ВБП, ВБМ) не отмечено достоверных различий между этими гистологическими типами РМЖ, p в диапазоне от 0,522 до 0,78.

Пролиферативный индекс, Ki-67

Уровни пролиферации были низкими у 4 больных, умеренными – у 88, высокими – у 15.

Ни по одному из критериев выживаемости (ОВ, БРВ, ВБП, ВБМ) не отмечено достоверных различий в зависимости от индекса пролиферации, p в диапазоне от 0,2 до 0,801.

Рецепторы эстрогенов

25 больных были отрицательны по рецепторам эстрогенов, 82 – положительны.

Общая и безрецидивная выживаемости не различались в зависимости от наличия или отсутствия рецепторов эстрогенов, $p=0,479$ и $p=0,223$ соответственно.

Вместе с тем, выживаемость без прогрессирования была существенно лучше при наличии эстрогенных рецепторов, лог-ранк тест $p= 0,007$; Бреслоу – 0,011; Тарон-Уоре – 0,008. Данные представлены на рисунке 6.

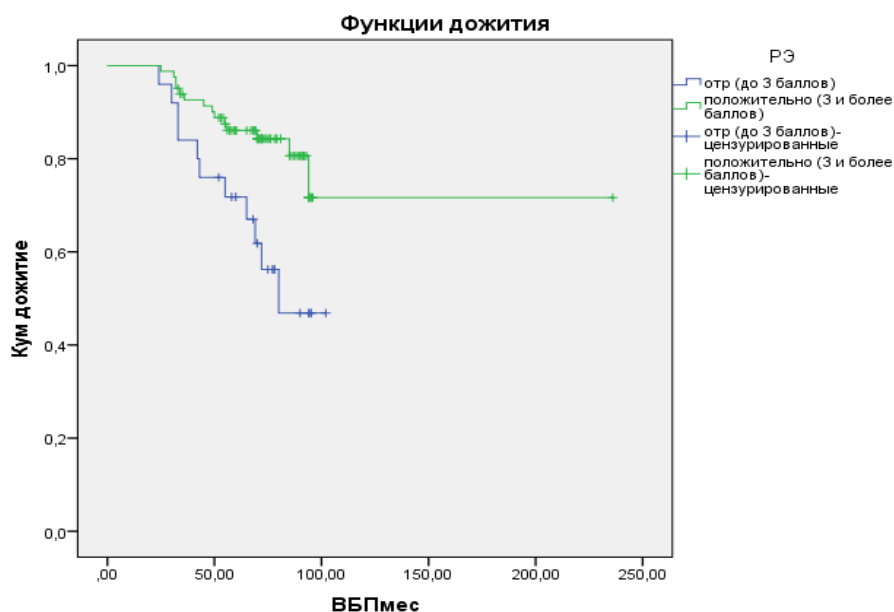


Рисунок 6 – Кривые выживаемости без прогрессирования по Каплан-Майер в зависимости в зависимости от наличия рецепторов эстрогенов в опухоли

Безметастатическая выживаемость также была достоверно более низкой в группе больных с отсутствием экспрессии эстрогенных рецепторов: лог-ранк тест $p=0,026$; Бреслоу – $0,016$; Тарон-Уоре – $0,017$. Данные представлены на рисунке 7.

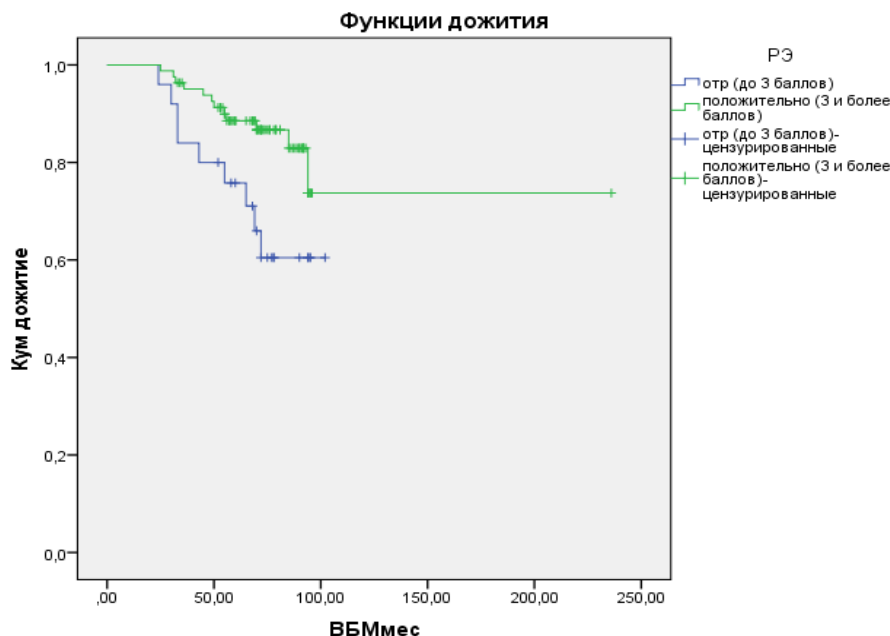


Рисунок 7 – Кривые безметастатической выживаемости по Каплан-Майер в зависимости от наличия эстрогенных рецепторов

Рецепторы прогестерона

Рецепторы прогестерона были отрицательными у 35 больных и положительными у 72.

Не получено достоверных различий между группами по общей выживаемости ($p=0,995$), безрецидивной выживаемости ($p=0,084$) и безметастатической выживаемости ($p=0,139$).

Показатели выживаемости без прогрессирования достоверно различались по всем трем статистическим тестам, лог-ранк тест $p= 0,028$; Бреслоу – $0,022$; Тарон-Уоре – $0,021$. Данные представлены на рисунке 8.

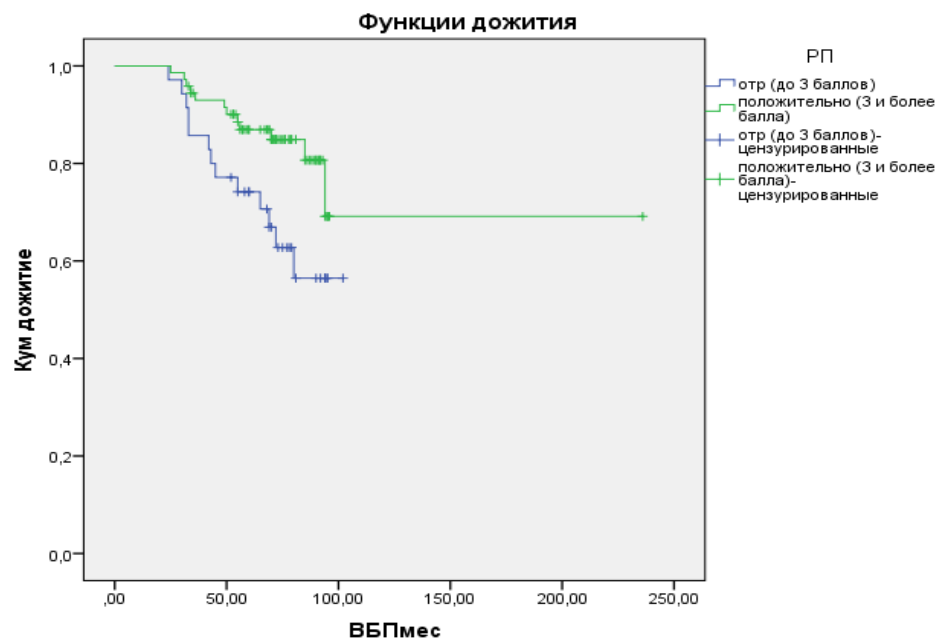


Рисунок 8 – Кривые выживаемости без прогрессирования по Каплан-Майер в зависимости от экспрессии рецепторов прогестерона

Her2/neu

Уровни экспрессии рецептора были отрицательными (0/1+) у 54 больных, 2+ - 37 больных, положительными (3+) – у 16 больных.

Ни по одному из критериев выживаемости (ОВ, БРВ, ВБП, ВБМ) не отмечено достоверных различий в зависимости от уровней экспрессии рецептора Her2/neu, p в диапазоне от 0,234 до 0,535.

Тип операции

В анализируемой группе больных радикальная резекция выполнена 41 пациентке, радикальная мастэктомия - 66.

По наши данным тип операции не влиял на прогноз (ОВ, БРВ, ВБП, ВБМ). Уровни значимости различий (p) по всем тестам были более 0,43.

Резюме

Наиболее важным клиническими факторами прогноза при раке молочной железы являются поражение регионарных лимфатических узлов (различия в

выживаемости близки к достоверным) и рецепторный статус опухоли. Наиболее информативным является критерий выживаемости без прогрессирования.

Интегральным фактором прогноза, влияющим на выбор тактики лечения, является в определенном смысле принадлежность больной к тому или иному молекулярному подтипу. Эти данные проанализированы в следующей главе.

3.1.2 Роль молекулярных подтипов рака молочной железы в прогнозе заболевания

Молекулярные подтипы рака молочной железы являются важным ориентиром в выборе тактики лечения больных. Это обусловлено различным прогнозом и чувствительностью к гормональной терапии, а также возможностью и необходимостью назначения таргетных препаратов (трастузумаб) в случаях экспрессии рецептора Her2/neu.

В нашей выборке больных распределение по молекулярным подтипам было следующим (Таблица 7).

Таблица 7 – Молекулярные подтипы рака молочной железы

Молекулярный подтип	Количество больных	Процент
Люминальный А	35	32,7
Люминальный В HER2/neu – негативный	38	35,5
Люминальный В HER2/neu – позитивный	16	14,9
Нелюминальный Her2- позитивный	5	4,7
Тройной негативный	13	12,2
Всего	107	100

Общая выживаемость

Сравнили показатели выживаемости при этих подтипах рака молочной железы. Результаты представлены на рисунке 9.

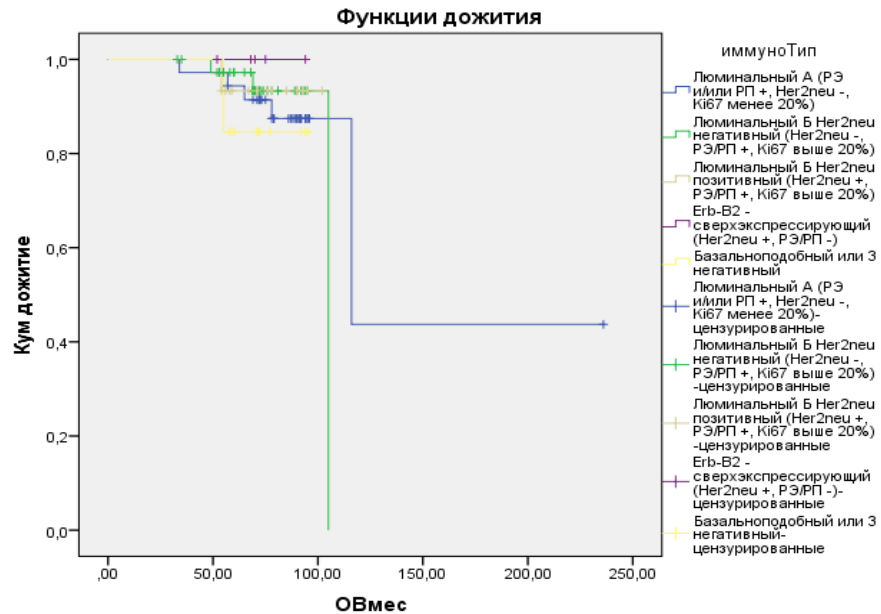


Рисунок 9 – Показатели общей выживаемости при различных молекулярных подтипах рака молочной железы (тест лог-ранк, 4 степени свободы)

Как видно из представленных данных, наилучшие показатели выживаемости получены при Erb-B2-сверхэкспрессирующем подтипе: ни одна из больных не погибла в сроки наблюдения до 75 мес.

Мы сопоставили Erb-B2-сверхэкспрессирующий подтип с другими подтипами рака молочной железы попарно. Сравнение Erb-B2-сверхэкспрессирующего подтипа с люминальным А подтипом рака молочной железы. Достоверных различий не выявлено, $p=0,52$ (лог-ранк тест). Сравнение Erb-B2-сверхэкспрессирующего подтипа с люминальным В Her2-негативный подтип рака молочной железы. Достоверных различий не выявлено, $p=0,61$ (лог-ранк тест). Сравнение Erb-B2-сверхэкспрессирующего подтипа с люминальным В Her2-позитивным подтипом рака молочной железы. Достоверных различий не выявлено, $p=0,61$ (лог-ранк тест).

Сравнение Erb-B2-сверхэкспрессирующего подтипа с базальноклеточным (тройной негативный) подтипом рака молочной железы. Достоверных различий не выявлено, $p=0,42$ (лог-ранк тест).

Таким образом молекулярный подтип рака молочной железы в условиях современной терапии не влияет на общую выживаемость больных раком молочной железы. Наиболее благоприятным с точки зрения общей выживаемости при сроках наблюдения до 75 мес. оказался Erb-B2-гиперэкспрессирующий подтип. Вероятно, это связано с эффективностью терапии с применением таргетного препарата трастузумаба.

Безрецидивная выживаемость

Показатели безрецидивной выживаемости были оценены также у 107 больных. Распределение по подтипам было таким же, как при анализе общей выживаемости.

При сравнении всех 5 подтипов (4 степени свободы) различия в показателях общей выживаемости были близки к достоверным, $p=0,09$.

При сравнении Erb-B2-гиперэкспрессирующего подтипа попарно с другими молекулярными подтипами получены следующие данные.

Сравнение с люминальным А подтипом и Her2-позитивным люминальным В подтипом было невозможным, так как рецидивов не было ни в одной из групп сравнения.

Достоверных различий в показателях выживаемости Erb-B2-гиперэкспрессирующего подтипа с люминальным В Her-2-негативным подтипом и тройным негативным подтипом не было, $p=0,603$ и $p=0,397$ соответственно.

Эти данные однозначно указывают, что тройной негативный подтип различается по безрецидивной выживаемости либо с люминальным А, либо с люминальным В Her2-позитивным подтипом.

Действительно, сравнение тройного негативного подтипа с люминальным А подтипом выявило достоверные различия, $p=0,005$ (Рисунок 10).

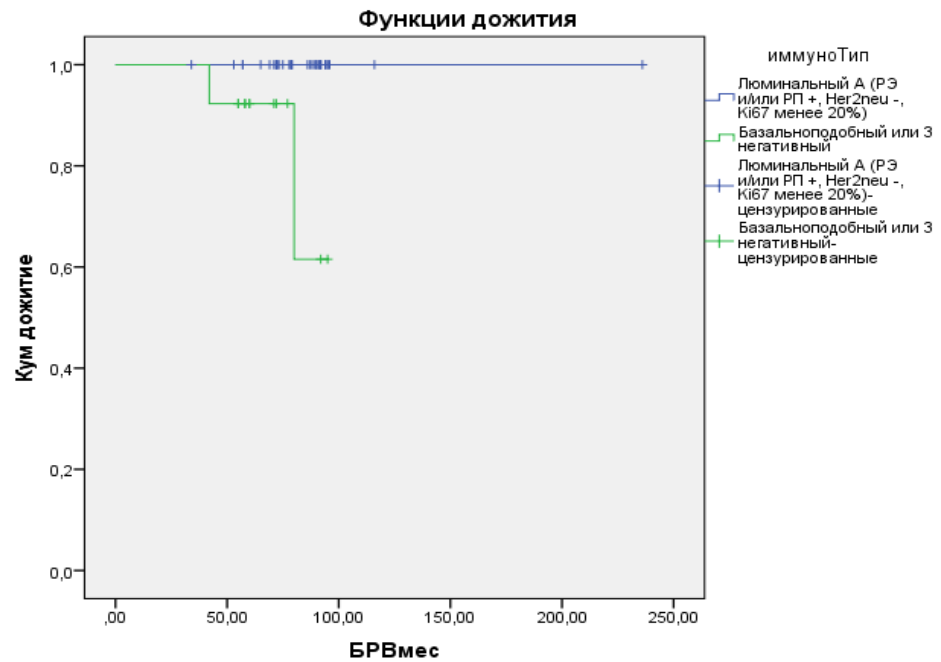


Рисунок 10 – Показатели безрецидивной выживаемости при тройном негативном и люминальном А подтипах рака молочной железы

Аналогичным образом, сравнили безрецидивную выживаемость при люминальном В Her2-позитивном подтипе с тройным негативным подтипом. В данном случае различия были близки к достоверным, $p=0,08$.

Таким образом, люминальный подтип рака молочной железы достоверно взаимосвязан с безрецидивной выживаемостью. Достоверно более благоприятным по данному показателю является люминальный А подтип в сравнении с тройным негативным подтипом.

Выживаемость без прогрессирования

При сравнении всех 5 молекулярных вариантов рака молочной железы получены достоверные различия по всем статистическим тестам, $p = 0,002$ (лог-ранк); $p= 0,005$ (Бреслоу); $p=0,003$ (Тарон-Уоре) (Рисунок 11). Наилучшими показателями характеризуются подтип с гиперэкспрессией Erb-B2, худшими – базальноподобный (трижды негативный) подтип. При сравнении показателей выживаемости подтипа с гиперэкспрессией Erb-B2 и Her2-позитивного люминального В-подтипа получены не достоверные данные, $p=0,293$.

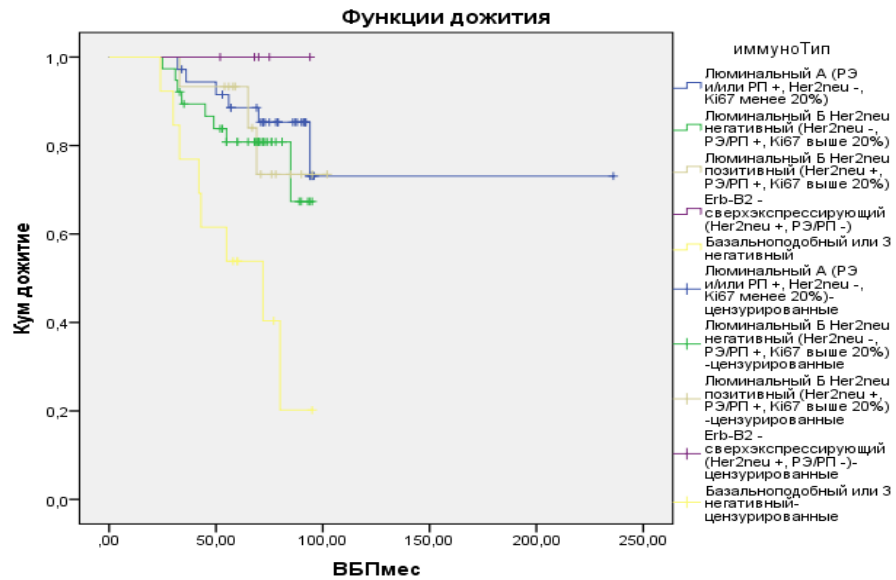


Рисунок 11 – Показатели выживаемости без прогрессирования при молекулярных подтипах рака молочной железы

Различия в безрецидивной выживаемости наблюдаются между люминальными подтипами и тройным негативным подтипом, $p=0,000$ (Рисунки 12, 13, 14).

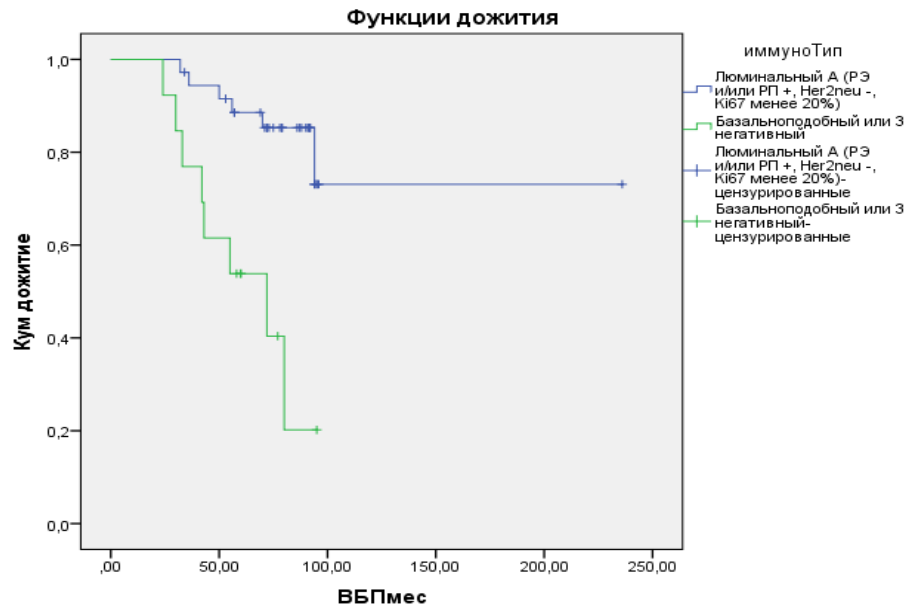


Рисунок 12 – Показатели безрецидивной выживаемости при тройном негативном подтипе с таковыми при люминальном А (тест лог-ранк)

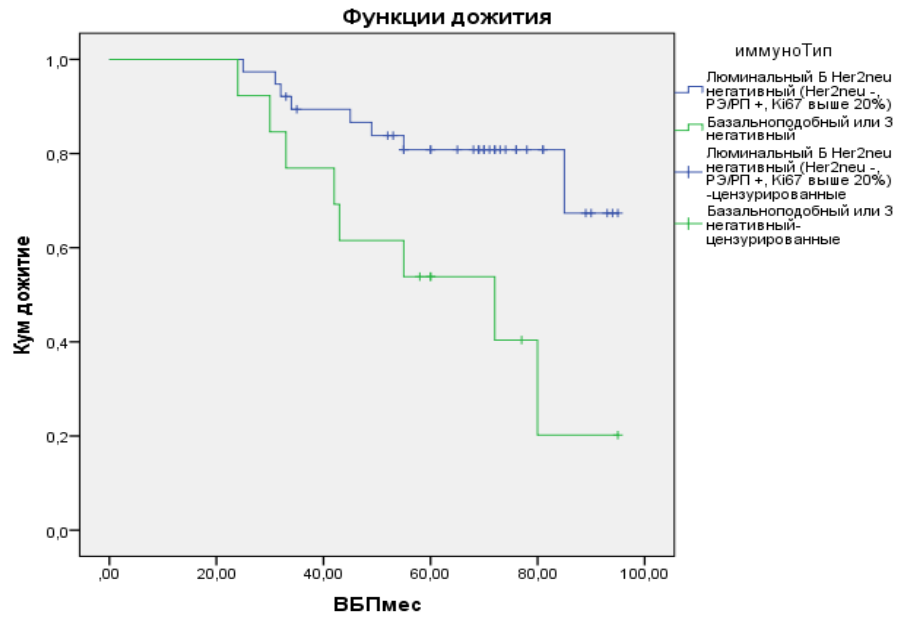


Рисунок 13 – Показателей выживаемости без прогрессирования при тройном негативном подтипе с люминальным В

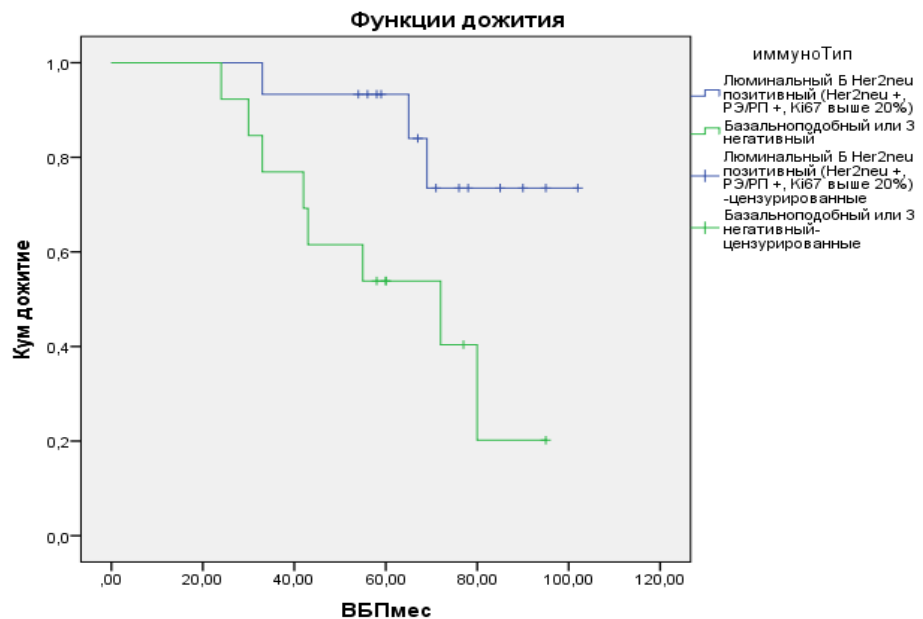


Рисунок 14 – Показатели выживаемости без прогрессирования при тройном негативном подтипе с люминальным В, Her2-позитивным подтипом также выявило достоверные различия (лог-ранк тест)

Важным показателем в прогнозе рака молочной железы является безметастатическая выживаемость. Оценка этого показателя в целом по группе

выявила достоверные различия ($p=0,038$, тест лог-ранк) между молекулярными вариантам рака молочной железы (Рисунок 15).

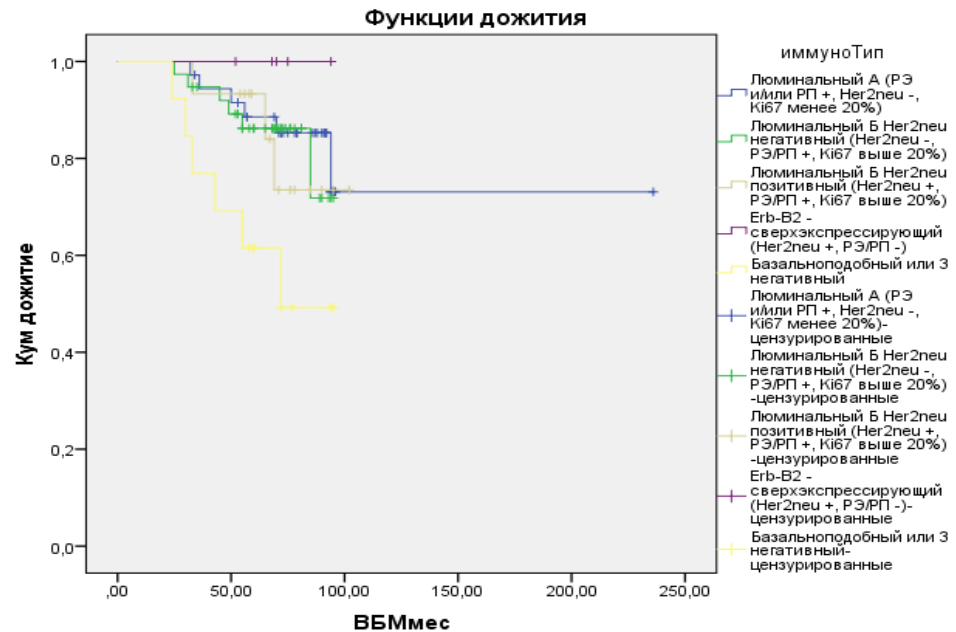


Рисунок 15 – Показатели безметастатической выживаемости при молекулярных подтипах рака молочной железы

Как и при анализе других показателей выживаемости, лучшим оказался рецептор-негативный вариант с гиперэкспрессией Her2/neu, а наиболее неблагоприятным – тройной негативный. Остальные варианты были примерно одинаковыми по безметастатической выживаемости.

Резюме

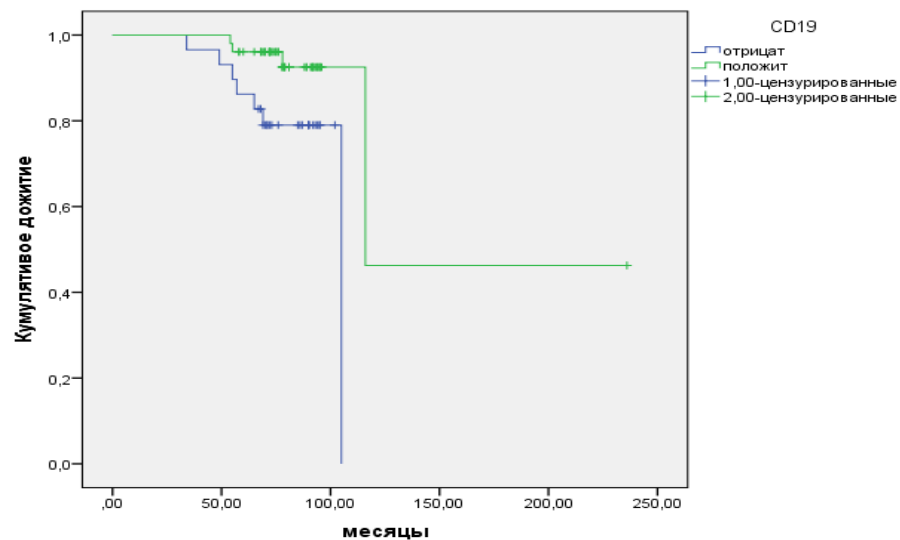
Молекулярные подтипы рака молочной железы существенно различаются по прогнозу. Показатели общей выживаемости не различаются между этими подтипами. Наиболее благоприятным с точки зрения показателей выживаемости является рецептор-негативный вариант с гиперэкспрессией Erb-B2. Наименее благоприятным является тройной негативный подтип. Остальные варианты примерно одинаковы по прогнозу – показателям безрецидивной выживаемости, безметастатической выживаемости и выживаемости без прогрессирования[126].

3.2 Роль субпопуляций лимфоцитов костного мозга в прогнозе рака молочной железы

3.2.1 Субпопуляции В-лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы в прогнозе заболевания

Общее количество (процент) В-лимфоцитов костного мозга было достоверно связано с прогнозом рака молочной железы. В случаях наличия В-лимфоцитов выше 10% показатели выживаемости были более благоприятными.

Как видно из представленных на рисунке 16 данных, кривые общей выживаемости расходятся в период 5-10 лет наблюдения, $p=0,019$.



Зеленый цвет – более 10% (51 больной), синий цвет – менее 10% (29 больных)

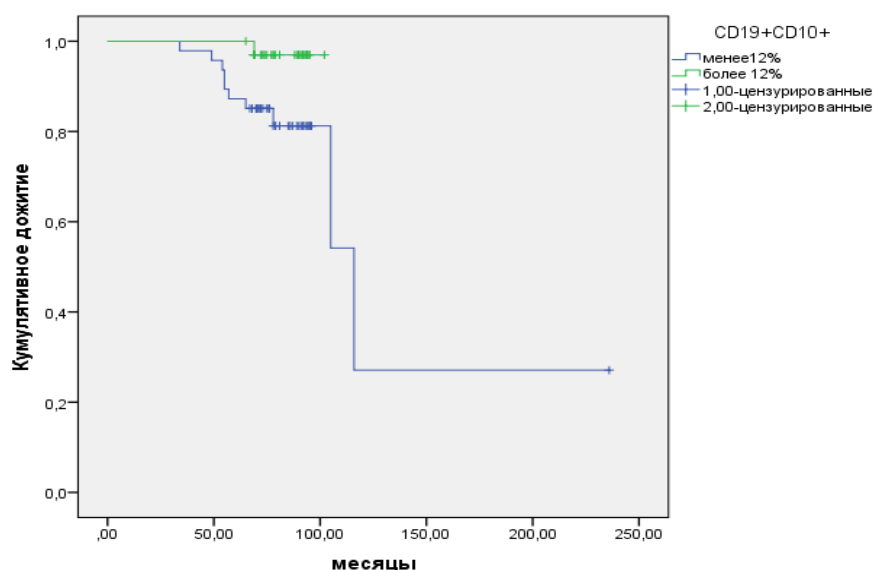
Рисунок 16 – Кривые общей выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от уровней В-лимфоцитов в костном мозге

Мы предприняли попытку оценить, какие из субпопуляций костномозговых В-лимфоцитов взаимосвязаны с прогнозом рака молочной железы. Оценили предшественники В-клеток (CD10+), CD38-позитивные В-клетки, субпопуляцию В1-лимфоцитов (CD5+).

Предшественники В-клеток (CD10+)

Наличие В-линейных предшественников в костном мозге ассоциировалось с более благоприятным прогнозом рака молочной железы.

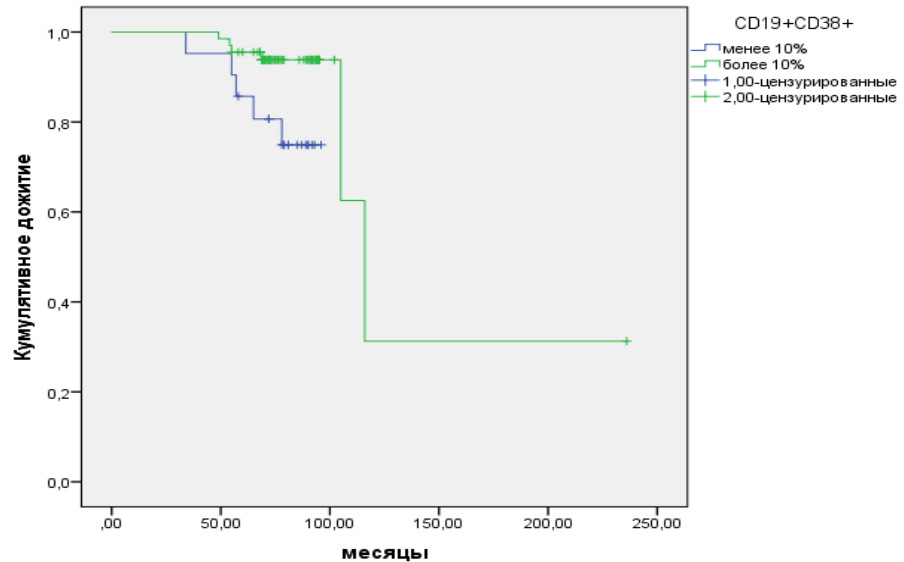
При пороговом уровне В-линейных предшественников (CD10+CD19+) 12% различия были достоверными, $p=0,042$ (Рисунок 17). Прогностическая роль антигена CD10 реализовывалась при сроках наблюдения за больными более 5 лет.



Зеленый цвет – более 12% (34 больных), синий цвет – менее 12% (47 больных)

Рисунок 17 – Показатели общей выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от уровней предшественников В-лимфоцитов (CD19+CD10+) в костном мозге

Роль экспрессии антигена CD38 на В-клетках костного мозга у больных раком молочной железы оценена у 87 больных. В качестве порогового использован уровень 10%. Как видно на рисунке 3, у больных с наличием антиген-положительных клеток в костном мозге более 10% отмечены более высокие уровни общей выживаемости, $p=0,026$. Достоверные различия в выживаемости реализовывались при сроках наблюдения 5- 8 лет, , $p=0,026$ (Рисунок 18).



Зеленый цвет – более 10% (67 больных), синий цвет – менее 10% (21 больной)

Рисунок 18 – Показатели общей выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от уровней предшественников В-лимфоцитов, экспрессирующих антиген CD38 (CD19+CD38+) в костном мозге

Прогностическая роль В1-лимфоцитов костного мозга у больных раком молочной железы

Прогностической роли В1-лимфоцитов при раке в последнее время уделяется большое внимание. Считается, что именно эта субпопуляция В-клеток ответственна за специфическую элиминацию злокачественных клеток на ранних этапах их возникновения. Частота случаев с наличием более 10% CD19+CD5+ лимфоцитов в костном мозге составила 41% (36 из 87), частота случаев с более низкими значениями этих клеток составила 59%.

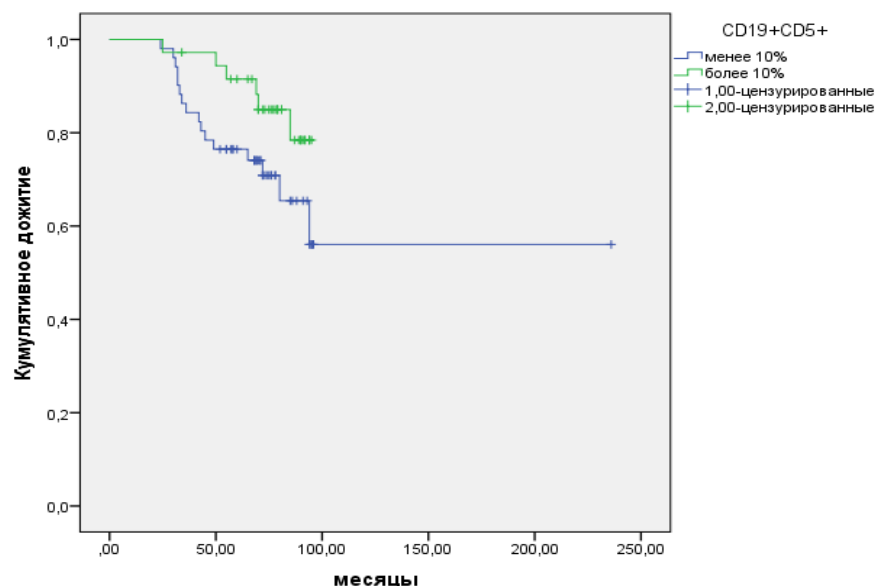
Нами не отмечено различий в общей выживаемости между этими группами, $p=0,934$.

Помимо общей выживаемости нами были оценены другие показатели выживаемости: безрецидивная выживаемость, выживаемость без прогрессирования, выживаемость без метастазов.

Ни один из этих показателей не был связан с уровнями В-лимфоцитов, их предшественников (CD10+), CD38-позитивной популяцией В-клеток или уровнями В1-лимфоцитов в костном мозге больных раком молочной железы. Наиболее близким к достоверным были показатели безрецидивной выживаемости для общего содержания В-клеток (CD19+), $p=0,154$.

Интересно отметить, что уровни В1-лимфоцитов, хотя и не оказывали влияния на общую выживаемость больных раком молочной железы, характеризовали группу несколько более благоприятного прогноза по безрецидивной выживаемости и выживаемости без прогрессирования ($p=0,07$), (Рисунок 19). Причем, разница в этих показателях наблюдалась уже начиная с 3-летнего периода наблюдения после операции [127].

Интересно отметить, что на основании анализа безрецидивной выживаемости в группе больных раком молочной железы с высоким индексом пролиферативной активности Ki-67 значимость различий в выживаемости больных с высокими и низкими В1-клетками составила 0,06.



Зеленый цвет – более 10% (36 больных), синий цвет – менее 10% (51 больной)

Рисунок 19 – Кривые выживаемости без прогрессирования больных раком молочной железы в зависимости от уровней В1-лимфоцитов (CD19+CD5+) в костном мозге

Субпопуляция В1-лимфоцитов костного мозга была связана с выживаемостью без прогрессирования и безрецидивной выживаемостью больных. Учитывая важную роль, придаваемую в последнее время В1-клеткам, мы проанализировали, насколько признаки (экспрессия CD5 на В-клетках и наличие рецидивов болезни) взаимосвязаны между собой (Таблица 8).

Таблица 8 – Взаимосвязь уровней В1-лимфоцитов в костном мозге больных раком молочной железы с наличием рецидивов заболевания

Уровень В1-лимфоцитов	Наличие рецидива		Всего
	Нет	Есть	
Менее 10%	47* (92,2%**)	4 (7,8%)	51 (100%)
Более 10%	36 (100%)	0 (0%)	36 (100%)
Всего	83 (95,4%)	4 (4,6%)	87 (100%)

- Количество в строке, ** Процент в строке
Взаимосвязь между признаками не носила достоверного характера, $p=0,085$.

Резюме

В-линейные предшественники и CD38-позитивные В-лимфоциты, а точнее их значительное количество в костном мозге – являются фактором благоприятного прогноза при раке молочной железы. Прогностическая роль В1-лимфоцитов костного мозга у больных раком молочной железы, вероятно, реализуется при оценке показателей безрецидивной выживаемости и выживаемости без прогрессирования. ($p=0,07$). Для окончательного суждения на этот счет необходимы дополнительные исследования.

3.2.2 Т- и НК-клеточные субпопуляции лимфоцитов костного мозга в прогнозе рака молочной железы

Нами изучены следующие субпопуляции: CD3-лимфоциты, субпопуляции CD4 и CD8-лимфоцитов, соотношение или так называемый иммунорегуляторный

индекс (CD4/ CD8), активированные Т-клетки – CD3+HLA-DR+, CD45RO-лимфоциты, Т-регуляторные клетки (CD4+CD25+), CD16+CD56+ - лимфоциты и 2 субпопуляции NK-клеток – CD 16+ CD3- и CD56+ CD 3-.

Зрелые Т-лимфоциты (CD3+)

Общее содержание зрелых Т-лимфоцитов в костном мозге изучено у 95 больных раком молочной железы, к положительным случаям отнесены 54 пациентки, к отрицательным – 41. Сравнение показателей выживаемости в этих 2 группах не выявило достоверных различий: ОВ – $p=0,416$; БРВ – $p=0,453$, ВБМ – $p=0,311$. Выживаемость без прогрессирования не достоверно различалась между группами ($p=0,198$), причем, начиная с 70-мес, в группе с низкими показателями CD3 прогрессирования заболевания не наблюдалось (Рисунок 20).

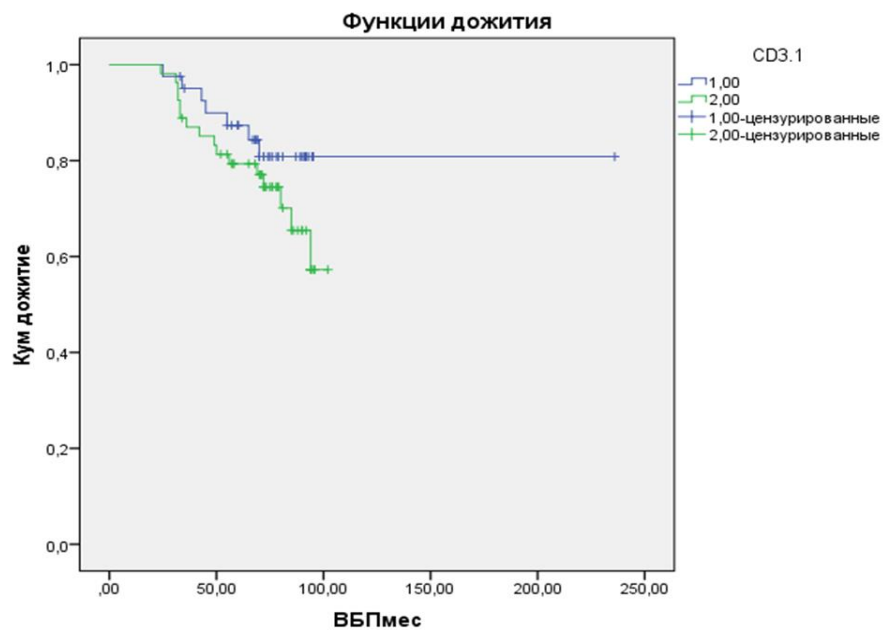


Рисунок 20 – Выживаемость без прогрессирования больных раком молочной железы при различных уровнях CD3-лимфоцитов в костном мозге

Если проанализировать показатели выживаемости без прогрессирования при сроках наблюдения более 70 мес., то они близки к достоверным, $p=0,08$; в группах сравнения 21 (низкие уровни CD3) и 33 больных (нормальные и высокие

уровни CD3). Интересно отметить, что более высокие уровни выживаемости отмечены при низких уровнях CD3, $p=0,08$ (Рисунок 21).

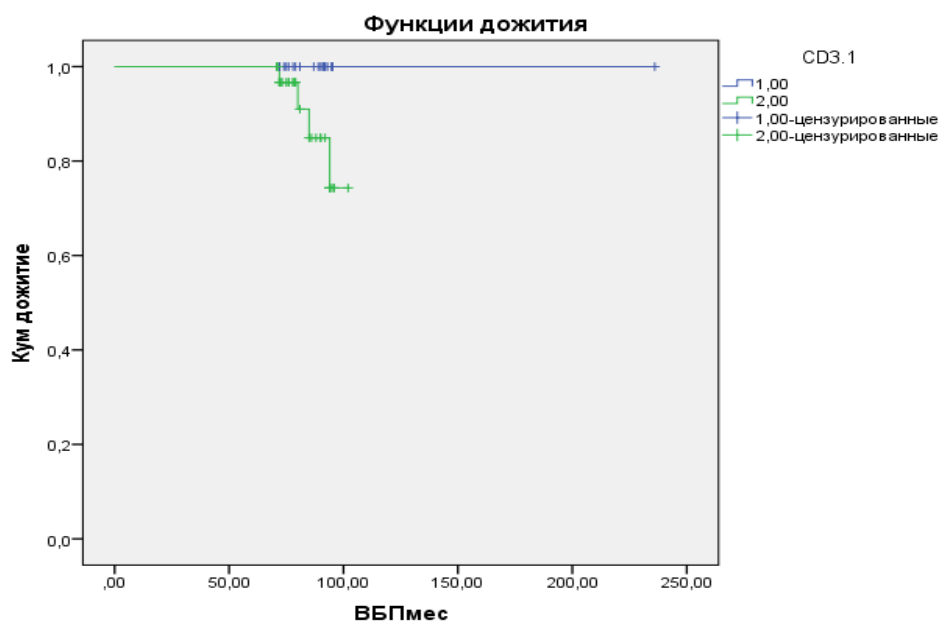


Рисунок 21 – Показатели выживаемости без прогрессирования в группе больных раком молочной железы с низкими уровнями костномозговых CD3-лимфоцитов

CD 8-лимфоциты

CD8-субпопуляция лимфоцитов костного мозга изучена у 90 больных раком молочной железы. У 72 больных уровни CD8-клеток были достаточно высокими, у 18 – низкими.

Уровни CD8-лимфоцитов не влияли на оцененные нами показатели выживаемости – ОВ ($p=0,747$), БРВ ($p=0,363$), ВБП ($p=0,921$) и ВБМ ($p=0,611$).

CD4-лимфоциты костного мозга

Эта популяция костномозговых лимфоцитов изучена у 90 больных. Нормальные и повышенные значения отмечены в 61 случае, сниженные – в 29.

Показатели безрецидивной выживаемости не различались в зависимости от уровней CD 4+ лимфоцитов (БРВ $p=0,223$). Выживаемость без прогрессирования

была практически одинаковой в двух группах ($p=0,86$). Сходными были показатели безметастатической выживаемости ($p=0,719$) [128].

Общая выживаемость больных была более продолжительной в случаях более высокого содержания CD4-лимфоцитов, и по ряду статистических тестов различия были достоверными (лог ранк – $p=0,128$; Бреслоу - $p=0,028$; Тарон-Уорре – $p=0,032$). Кривые общей выживаемости приведены на рисунке 22.

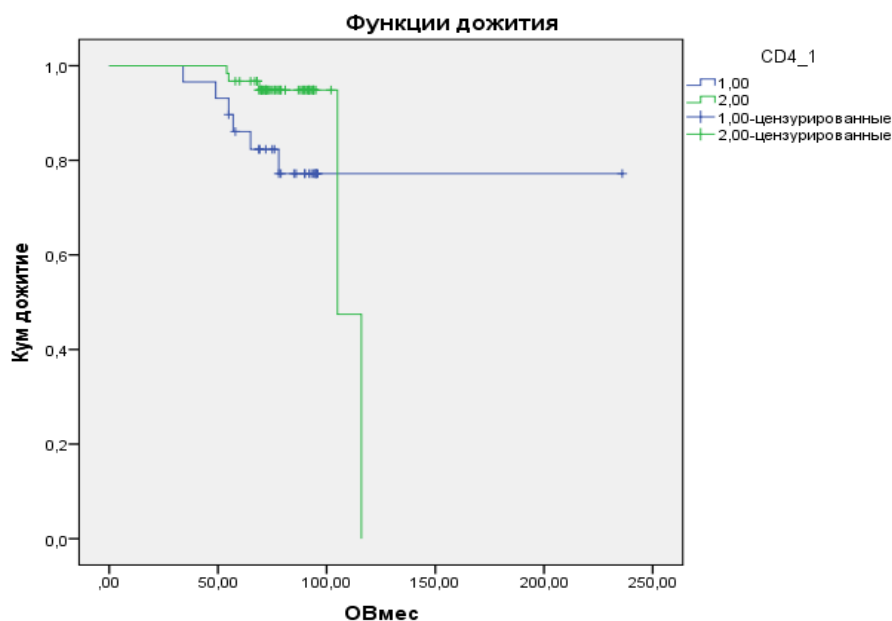


Рисунок 22 – Кривые общей выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от уровней CD4-позитивных лимфоцитов костного мозга

Соотношение CD4/ CD8

Иммунорегуляторный индекс CD4/CD8 изучен у 89 больных раком молочной железы. В 60 случаях значения расценены как нормальные или повышенные, в 29 – как сниженные.

Ни по одному из показателей выживаемости различия не были достоверными: ОБ ($p=0,781$), БРВ ($p=0,272$), ВБП ($p=0,319$), ВБМ ($p=0,543$).

Субпопуляция активированных CD8-лимфоцитов (CD8+HLA-DR+)

Эта субпопуляция изучена у 76 больных. В 51 случае данные расценены как отсутствие активации, в 25 – с наличием активации.

Не было различий между группами по общей выживаемости ($p=0,353$), безрецидивной выживаемости ($p=0,256$) и безметастатической выживаемости ($p=0,146$).

Различия в выживаемости без прогрессирования были близки к достоверным: тест лог-ранк $p=0,064$; Бреслоу - 0,121; Тарон-Уоре – 0,146. Кривые выживаемости без прогрессирования представлены на рисунке 23.

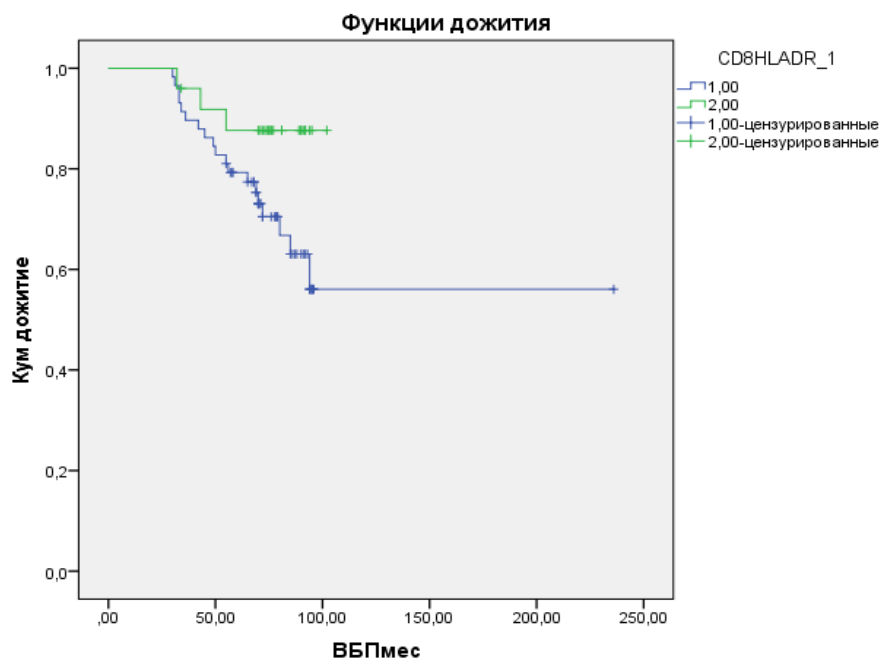


Рисунок 23 – Кривые выживаемости без прогрессирования у больных раком молочной железы в зависимости от уровней активированных CD8+HLA-DR+ лимфоцитов костного мозга

Следует отметить, что реализация прогностической роли активированных цитотоксических лимфоцитов происходит в сроки наблюдения до 8 лет после операции (94 мес.), где достоверность достигает уровня $p=0,051$ (Рисунок 24).

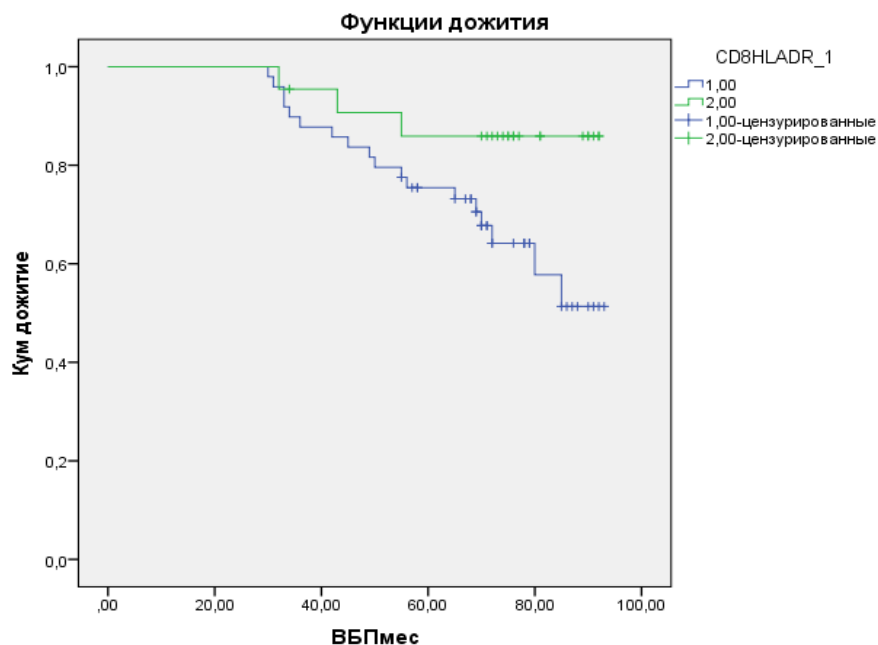


Рисунок 24 – Кривые выживаемости без прогрессирования больных раком молочной железы в сроки наблюдения до 8 лет

Активированные CD3+HLA-DR+ лимфоциты

Данная субпопуляция изучена всего лишь у 41 больной. Активированные Т-клетки установлены в 13 случаях. Ни по одному из показателей выживаемости достоверных различий не установлено: ОВ ($p=0,909$); БРВ ($p=0,157$); ВБП ($p=0,78$); ВБМ ($p=0,44$).

Популяция Т-регуляторных клеток изучена у 80 больных. Однако отчетливые уровни CD4+ CD25+ лимфоцитов имели место лишь в 2 случаях, что не позволило провести статистический анализ.

Популяция CD 45RO-позитивных Т-лимфоцитов костного мозга изучена у 71 больной раком молочной железы. Низкие значения установлены в 8 случаях.

Ни по одному из показателей выживаемости (ОВ, БРВ, ВБП, ВБМ) достоверной разницы между группами не установлено, p в диапазоне от 0,35 до 0,779.

Популяция CD16+ CD56+ лимфоцитов

Данный тип клеток изучен у 31 больной. В 9 случаях имела место отчетливая положительная реакция, в остальных данный показатель был низким.

Ни по одному из показателей выживаемости не получено достоверных различий в зависимости от уровней CD16+ CD56+ лимфоцитов: ОВ (p=0,36), БРВ (p=0,36), ВБП (p=0,67), ВБМ (p=0,88).

Популяции НК-клеток

CD16+ CD3-

К положительным случаям отнесены 23, к отрицательным – 21.

Различий между группами не установлено: ОВ (p=0,727), БРВ (p=0,083), ВБП (p=0,342), ВБМ (p=0,96).

CD56+ CD3-

Анализ был проведен всего лишь у 20 больных – 9 с наличием НК-клеток, 11- с их отсутствием. Статистический анализ был невозможен.

Резюме

При оценке влияния на выживаемость больных раком молочной железы уровней Т- и НК-клеточных субпопуляций костного мозга выявлен ряд интересных фактов.

Основная связь с прогнозом продемонстрирована для CD4-лимфоцитов – наличие ощутимого числа этих клеток в костном мозге ассоциировалось с благоприятным прогнозом: более продолжительной общей выживаемостью.

Общее содержание Т-клеток (CD3), Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8) и соотношение CD4/CD8 не влияли на прогноз, так же, как и субпопуляции активированных Т-клеток (HLA-DR+), CD45RO+. Не установлено влияния на прогноз CD16+CD56+ лимфоцитов, а также НК-клеток (CD16+CD3-).

Активированные CD8+ лимфоциты (HLA-DR+) могут быть взаимосвязаны с лучшими показателями выживаемости без прогрессирования (данные близки к достоверным), однако, для доказательства этого факта потребуются дополнительные исследования на большем числе больных.

3.3 Взаимосвязь костномозговых субпопуляций лимфоцитов у больных раком молочной железы с молекулярными подтипами заболевания

В предыдущих главах нами показаны достаточно интересные прогностические данные при раке молочной железы: В, Т-линейные субпопуляции лимфоцитов костного мозга были взаимосвязаны в основном с показателями общей выживаемости. Это чрезвычайно важно, так как отражает в целом прогноз заболевания. Молекулярные подтипы рака молочной железы находили отражение не в общей выживаемости, а в безрецидивной, без прогрессирования и безметастатической выживаемости. Это, в свою очередь, отражает биологическое «поведение» опухоли, что может в дальнейшем нивелироваться коррекцией химио-, лучевой или гормональной терапии. Здесь благоприятным был рецептор-негативный вариант с гиперэкспрессией Erb-B2, а неблагоприятным – тройной негативный вариант.

Мы сравнили, связаны ли молекулярные варианты рака молочной железы с уровнями субпопуляций лимфоцитов костного мозга больных.

Достоверной связи при анализе сопряженности экспрессии CD19 с молекулярными типами не отмечено (Хи-квадрат 3,8; $p=0,43$), (Таблица 9).

Таблица 9 – Сопряженность экспрессии CD19 с молекулярными подтипами рака молочной железы

Молекулярный подтип		CD19		Итого
		отрицательно	положительно	
Люминальный А	Частота	12	20	32
	Процент	37,5%	62,5%	100%
Люминальный В Her2neu негативный	Частота	6	17	23
	Процент	26,1%	73,9%	100%
Люминальный В Her2neu позитивный	Частота	7	5	12
	Процент	58,3%	41,7%	100%

Нелюминальный Her2/neu позитивный	Частота	1	3	4
	Процент	25,0	75,0%	100%
Тройной негативный	Частота	3	6	9
	Процент	33,3	66,7%	100%
Итого	Частота	29	51	80
	Процент	36,3%	63,8	100%

Данные по сопоставлению уровней В-линейных предшественников (CD19+CD10+) с молекулярными типами также не выявили взаимосвязи (Хи-квадрат 3,2; $p=0,52$) (Таблица 10).

Таблица 10 – Сопряженность экспрессии CD19+CD10+ клеток костного мозга с молекулярными подтипами рака молочной железы

Молекулярный подтип		CD19+CD10+ клетки		Итого
		отрицательно	положительно	
Люминальный А	Частота	18	14	32
	Процент	56,3%	43,8%	100,0%
Люминальный В Her2neu негативный	Частота	14	12	26
	Процент	53,8%	46,2%	100,0%
Люминальный В Her2neu позитивный	Частота	6	5	11
	Процент	54,5%	45,5%	100,0%
Нелюминальный Her2/neu позитивный	Частота	4	0	4
	Процент	100,0%	0,0%	100,0%
Тройной негативный	Частота	5	3	8
	Процент	62,5%	37,5%	100,0%
Итого	Частота	47	34	81
	Процент	58,0%	42,0%	100,0%

Сопоставление с CD38-позитивными В-лимфоцитами также не выявило взаимосвязи (Chi квадрат 4,7, p=0,3) (Таблица 11).

Таблица 11 – Сопряженность экспрессии CD19+CD38+ клеток с молекулярными подтипами рака молочной железы

Молекулярный подтип		CD19+CD38+клетки		Итого
		отрицательно	положительно	
Люминальный А	Частота	11	23	34
	Процент	32,4%	67,6%	100,0%
Люминальный В Her2/neu негативный	Частота	4	24	28
	Процент	14,3%	85,7%	100,0%
Люминальный В Her2/neu позитивный	Частота	4	8	12
	Процент	33%	66,7%	100,0%
Нелюминальный Her2/neu позитивный	Частота	0	4	4
	Процент	0,0%	100,0%	100,0%
Тройной негативный	Частота	2	8	10
	Процент	20,0%	80,0%	100,0%
Итого	Частота	21	67	88
	Процент	23,9%	76,1%	100,0%

Взаимосвязь субпопуляции В1 лимфоцитов (CD19+CD5+) с молекулярными подтипами рака молочной железы была близка к достоверной, p=0,11 (Таблица 12).

Таблица 12 – Сопряженность экспрессии CD19+CD5+ с молекулярными типами

Молекулярный подтип		CD19+CD5+ клетки		Итого
		отрицательно	положительно	
Люминальный А	Частота	14	17	31
	Процент	45,2%	54,8%	100,0%

Продолжение таблицы 12

Люминальный В Her2neu негативный	Частота	21	11	32
	Процент	65,6%	34,4%	100,0%
Люминальный В Her2neu позитивный	Частота	6	3	9
	Процент	25,0%	75,0%	100,0%
Нелюминальный Her2/neu позитивный	Частота	1	3	4
	Процент	25,0%	75,0%	100,0%
Тройной негативный	Частота	9	2	11
	Процент	81,8%	18,2%	100,0%
Итого	Частота	51	36	87
	Процент	58,6%	41,4%	100,0%

Это обусловлено, по-видимому, низкой частотой CD5+CD19+ популяции при тройном негативном раке (18,2%) и высокой (75%) при рецептор-негативном Her2/neu-позитивном варианте в сравнении с остальными подтипами (33 - 55%)

Учитывая более низкую частоту встречаемости популяции В1-лимфоцитов костного мозга при тройном негативном молекулярном подтипе рака молочной железы, мы сравнили средние значения В1-лимфоцитов костного мозга при тройном негативном и остальных молекулярных подтипах (Таблица 13).

Таблица 13 – Сравнение среднего значения В1-лимфоцитов костного мозга при тройном негативном и остальных молекулярных подтипах рака молочной железы

	Имунофенотип	N	Среднее	Стандартная ошибка среднего
CD19+CD5+ клетки	Иные варианты	76	19,3121	2,94100
	Тройной негативный	11	8,9673	4,61590

Хотя уровни В1-клеток были в 2 раза ниже при тройном-негативном подтипе рака молочной железы, различия не были достоверными, $p=0,07$.

Достоверной связи между признаками (по таблицам сопряженности) также не было: Хи-квадрат 2,8, $p=0,114$.

Эти данные являются достаточно интересными. Низкие уровни В1-клеток костного мозга явились единственным иммунологическим показателем, который был взаимосвязан с более низкой безрецидивной, без прогрессирования и безметастатической выживаемостью. Аналогичным образом тройной-негативный подтип был также прогностически неблагоприятным фактором на основании этих показателей. Интересно отметить, что частота значимых уровней В1-лимфоцитов была наиболее низкой при базальноклеточном типе, и средние уровни В1-лимфоцитов были вдвое более низким при базальноклеточном типе. Трудно представить, что первичным здесь являются уровни В-клеток костного мозга, скорее, речь идет о некоем иммунодефиците костномозговых В1-лимфоцитов, ассоциированном с возникновением тройной-негативного подтипа рака молочной железы.

Наиболее благоприятным с точки зрения показателей выживаемости явился молекулярный тип с гиперэкспрессией Erb-B2, однако, этих больных было в нашей выборке всего лишь 5. И, хотя уровни В1-лимфоцитов были при этом типе максимальными (Таблица 14), различия не были достоверными, $p=0,43$.

Таблица 14 – Сравнение среднего значения В1-лимфоцитов костного мозга при гиперэкспрессии Erb-B2 и остальных молекулярных подтипах рака молочной железы

CD19+CD5+ клетки	Имунофенотип	N	Среднее	Стандартная ошибка среднего
	Иные подтипы	83	17,5420	2,69416
Гиперэкспрессия Erb-B2	4	27,5925	15,51197	

Интересным оказалось сравнение по уровням В1-клеток наиболее благоприятного (с гиперэкспрессией Her2/neu) и наименее благоприятного (тройного-негативного) типов рака молочной железы (Таблица 15).

Таблица 15 – Сравнение по уровням В1-лимфоцитов костного мозга тройного-негативного подтипа рака молочной железы с подпитом гиперэкспрессией Erb-B2

CD19CD5	Иммунофенотип	N	Среднее	Стандартная ошибка среднего
	Тройной негативный	11	8,9673	4,61590
	С гиперэкспрессией Erb-B2	4	27,5925	15,51197

Разница в уровнях В1-клеток была более, чем троекратной, однако, в силу малого числа наблюдений различия не достоверны, $p=0,136$.

Еще один аспект очень важен. Уровень значимости различий в выживаемости для популяции В1-лимфоцитов возрастал в группе больных раком молочной железы с высокой пролиферативной активностью (Ki-67 более 20%), (Таблица 16).

Таблица 16 – Взаимосвязь уровней В1-лимфоцитов с молекулярным типом (с гиперэкспрессией Erb-B2, тройным негативным подтипом) в группе больных с высокой пролиферативной активностью (Ki-67 более 20%)

		CD19+CD5+		Итого
		Отрицательно	Положительно	
Нелюминальный Her2/neu позитивный	Частота	1	3	4
	Процент	25,0%	75,%	100,0%
Тройной негативный	Частота	9	2	11
	Процент	81,0%	8,2%	100,0%

Итого	Частота	10	5	15
	Процент	66,7%	33,3%	100,0%

В группе больных с высокой пролиферативной активностью взаимосвязь уровней В1-лимфоцитов с молекулярным типом (с гиперэкспрессией Erb-B2, тройным негативным) была достоверной, $p=0,039$.

Средние уровни В1-лимфоцитов, тем не менее достоверно не различались, $p=0,136$ (Таблица 17).

Таблица 17 – Показатели уровня В1-лимфоцитов костного мозга тройного-негативного подтипа рака молочной железы и подтипа с гиперэкспрессией Erb-B2

CD19CD5	Имунофенотип	N	Среднее	Стандартная ошибка среднего
	Тройной негативный	11	8,9673	4,61590
	Нелюминальный Her2/neu позитивный	4	27,5925	15,51197

Оценили также взаимосвязь между молекулярными подтипами рака молочной железы и Т/НК-клеточными популяциями лимфоцитов костного мозга, имевшими взаимосвязь с показателями выживаемости (CD3, CD4, CD8+HLA-DR+).

CD4- лимфоциты

CD4-лимфоциты костного мозга не имели связи с молекулярными типами рака молочной железы, $p=0,543$ (Таблица 18).

Таблица 18 – Сопряженность экспрессии CD4-лимфоцитов костного мозга с молекулярными типами рака молочной железы

Молекулярный подтип		CD4		Итого
		отрицательно	положительно	
Люминальный А	Частота	14	19	33
	Процент	42,4%	57,6%	100,0%
Люминальный В Her2/neu негативный	Частота	8	22	30
	Процент	26,7%	73,3%	100,0%
Люминальный В Her2/neu позитивный	Частота	4	8	12
	Процент	33,3%	66,7%	100,0%
Нелюминальный Her2/neu позитивный	Частота	1	3	4
	Процент	25,0%	75,0%	100,0%
Тройной негативный	Частота	2	9	11
	Процент	18,2%	81,8%	100,0%
Итого	Частота	29	61	90
	Процент	32,2%	67,8%	100,0%

CD3-лимфоциты

Уровни зрелых Т-клеток костного мозга костного мозга также не имели связи с молекулярными подтипами рака молочной железы ($p=0,605$) (Таблица 19).

Таблица 19 – Сопряженность экспрессии CD3-лимфоцитов костного мозга с молекулярными типами рака молочной железы

Молекулярный подтип		CD3		Итого
		отрицательно	положительно	
Люминальный А	Частота	14	21	35
	Процент	40,0%	60,0%	100,0%

Люминальный В Her2/neu негативный	Частота	18	16	34
	Процент	52,9%	47,1%	100,0%
Люминальный В Her2/neu позитивный	Частота	4	8	12
	Процент	33,3%	66,7%	100,0%
Нелюминальный Her2/neu позитивный	Частота	2	2	4
	Процент	50,0%	50,0%	100,0%
Тройной негативный	Частота	3	7	10
	Процент	30,0%	70,0%	100,0%
Итого	Частота	41	54	95
	Процент	43,2%	56,8%	100,0%

CD8+HLA-DR+ лимфоциты

Уровни активированных Т-цитотоксических лимфоцитов не имели связи с молекулярными типами рака молочной железы ($p=0,601$) (Таблица 20).

Таблица 20 – Сопряженность экспрессии CD8+HLA-DR+ лимфоцитов костного мозга с молекулярными типами рака молочной железы

Молекулярный подтип		CD8+HLA-DR+		Итого
		отрицательно	положительно	
Люминальный А	Частота	22	10	32
	Процент	68,8%	31,2%	100,0%
Люминальный В Her2/neu негативный	Частота	15	10	25
	Процент	60,0%	40,0%	100,0%
Люминальный В Her2/neu позитивный	Частота	10	2	12
	Процент	83,3%	16,7%	100,0%
Нелюминальный Her2neu позитивный	Частота	3	1	4
	Процент	75,0%	25,0%	100,0%

Тройной негативный	Частота	8	2	10
	Процент	80,0%	20,0%	100,0%
Итого	Частота	58	25	83
	Процент	69,9%	30,1%	100,0%

3.4 Иммунологические факторы прогноза при люминальном раке молочной железы

Роль субпопуляций костномозговых лимфоцитов в прогнозе люминального рака молочной железы.

Ранее нами показано, что субпопуляции В-лимфоцитов и некоторых Т-клеток костного мозга имеют связь с прогнозом при раке молочной железы. Это было сделано по группе в целом, однако, прогностическая роль тройного негативного подтипа и подтипа с гиперэкспрессией Erb-B2 хорошо известна. Поэтому мы провели анализ при люминальных молекулярных подтипах рака молочной железы (Рисунок 25).

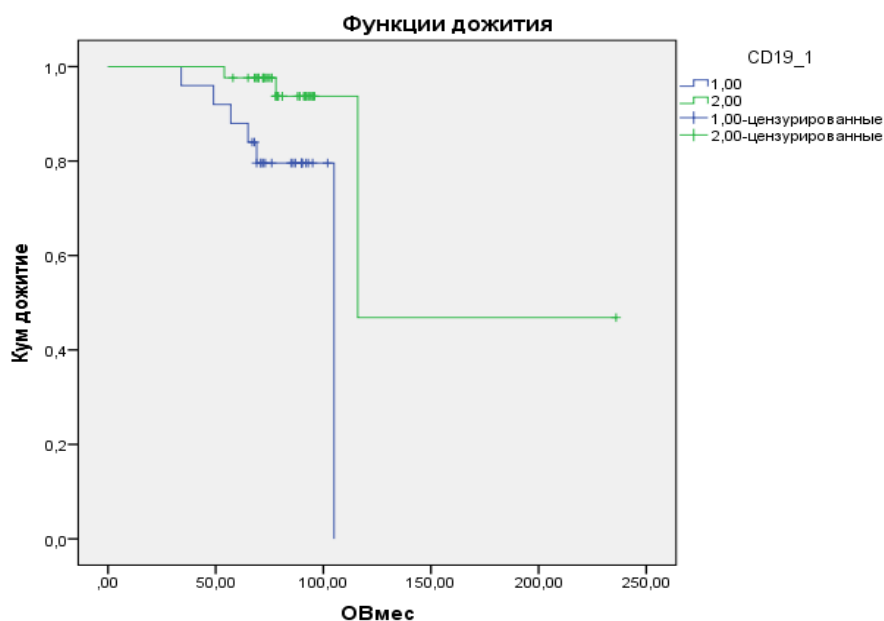


Рисунок 25 – Показатели общей выживаемости больных люминальным раком молочной железы в зависимости от уровней В-лимфоцитов

Экспрессия CD19 изучена в 67 случаях, из которых 42 характеризовались уровнями CD19 выше 10%. Различия в общей выживаемости были достоверными, $p=0,017$ (лог-ранк тест).

Популяция В-линейных предшественников была изучена у 69 больных, из которых 31 характеризовался уровнями CD19+CD10+ клеток выше 12%. В этом случае различия в выживаемости были близки к достоверным, $p=0,08$ (Рисунок 26).

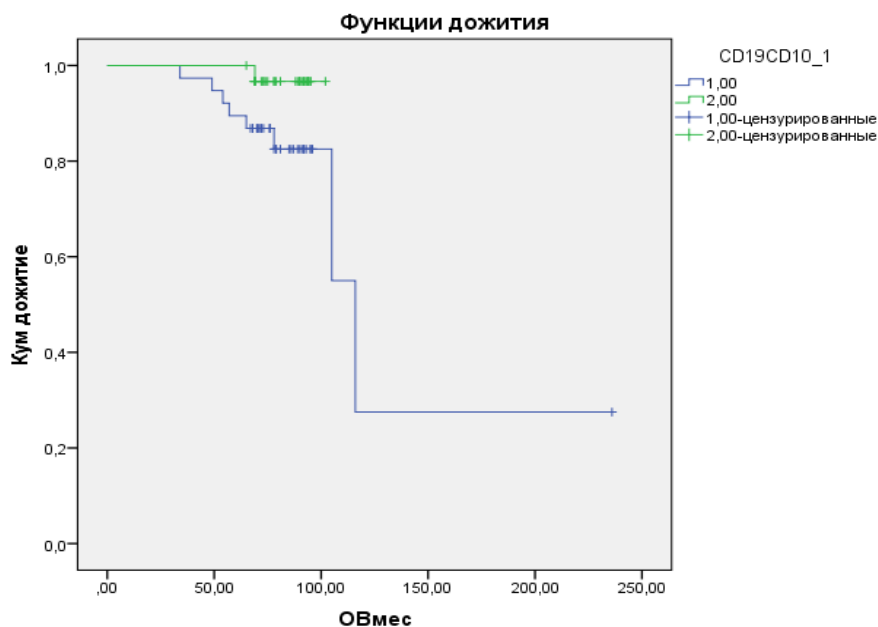


Рисунок 26 – Показатели общей выживаемости больных люминальным раком молочной железы в зависимости от уровней В-линейных предшественников (CD19+CD10+)

Популяция CD19+CD38+ изучена у 74 больных, из которых 55 расценены как позитивные по данному показателю. Различия были близки к достоверным, $p=0,067$ (Рисунок 27).

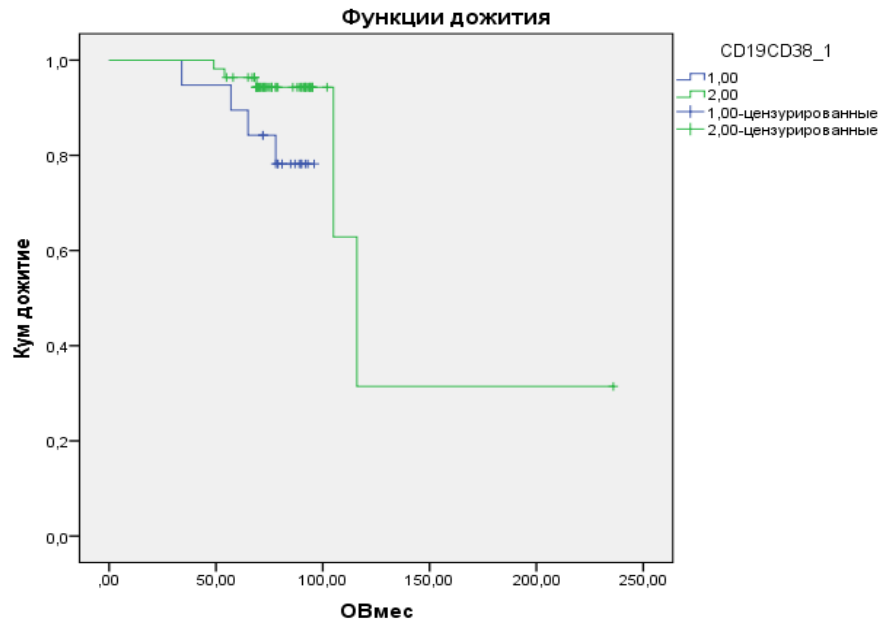


Рисунок 27 – Показатели общей выживаемости больных люминальным раком молочной железы в зависимости от уровней В-лимфоцитов (CD19+CD38+)

В1-лимфоциты (CD19+CD5+) костного мозга изучены у 72 больных, из которых 31 был позитивен. Разницы в показателях выживаемости не было, $p=0,51$.

Безрецидивная выживаемость

CD19, $p=0,195$

CD19+CD10+, $p=0,366$

CD19+CD38+, $p=0,557$

CD19+CD5+, $p=0,216$

Выживаемость без прогрессирования

CD19 $p=0,07$

CD19+CD10+ $p=0,26$

CD19+CD38+, $p=0,58$

CD19+CD5+, $p=0,705$

Выживаемость без метастазов

CD19, $p=0,137$

CD19+CD10+, $p=0,37$

CD19+CD38+, $p=0,69$

CD19+CD5+, $p=0,901$

Т-клеточные субпопуляции

Прогностическая роль костномозговых CD4-лимфоцитов, влияние на общую выживаемость при люминальных раках утрачивалась ($p=0,74$).

Связь уровней активированных цитотоксических клеток (CD8+HLA-DR+) с выживаемостью без прогрессирования также утрачивалась при люминальных раках ($p=0,54$).

Положительное влияние на выживаемость без прогрессирования низкого содержания зрелых Т-клеток (CD3+) при люминальных раках и сроках наблюдения более 70 мес. сохранялась (низкие уровни CD3-лимфоцитов 20 больных, нормальные и повышенные – 29 больных), но не носила достоверного характера ($p=0,176$) (Рисунок 28).

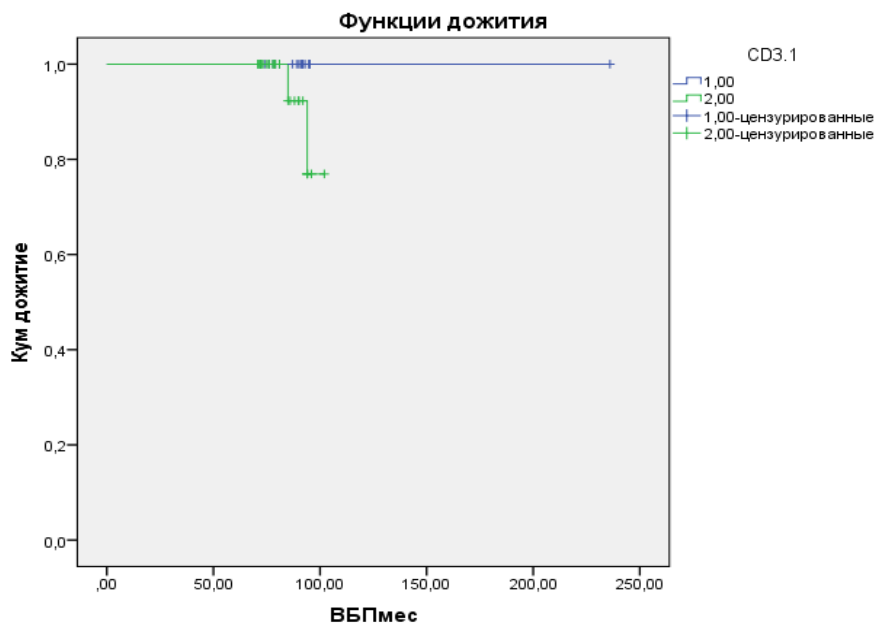


Рисунок 28 – Кривые выживаемости без прогрессирования больных люминальным раком молочной железы в зависимости от уровней CD3+ лимфоцитов

Следует отметить, что при люминальных раках, как и в целом по группе, ни у одной из 20 больных с низкими уровнями зрелых Т-клеток в костном мозге прогрессирования в сроки более 70 мес. после операции не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена изучению иммунологических факторов прогноза при операбельном раке молочной железы. С этой целью впервые проанализирован субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга пациенток. Выявлены показатели, взаимосвязанные с общей выживаемостью и выживаемостью без прогрессирования.

Для того, чтобы понять значение полученных данных для улучшения результатов лечения рака молочной железы обратимся к анализу показателей лечения, его результативности с точки зрения прогноза заболевания.

Для ранних раков молочной железы в качестве суррогатных маркеров эффективности терапии приняты (1) pCR (достижение полного ответа, устанавливаемого морфологически при анализе хирургически удаленной опухоли), (2) EFS (бессобытийная выживаемость), (3) DFS (выживаемость без признаков заболевания), (4) частота объективных ответов и (5) выживаемость без прогрессирования (PFS).

Полный патоморфологический ответ (pCR). Наиболее распространенным определением pCR является отсутствие резидуального инвазивного рака как в пределах молочной железы, так и в пределах лимфатических узлов при окраске гематоксилином-эозином в полностью резецированном образце молочной железы и всех изученных регионарных лимфатических узлах [129]. Стандартного определения pCR нет в различных исследованиях. FDA предложено 2 различных определения: (1) отсутствие инвазивного и неинвазивного рака в молочной железе и лимфатических узлах (ypT0 ypN0) [130]; (2) отсутствие резидуального инвазивного рака в молочной железе и лимфатических узлах вне зависимости от резидуальной неинвазивной болезни (ypT0/is ypN0) [131].

Очень важным вопросом, который всё ещё остается без ответа, является вопрос о необходимости включения больных резидуальной протоковой аденокарциномой *in situ* (DCIS) в число больных pCR: не ясно, ведет ли это к снижению безрецидивной выживаемости (RFS) или общей выживаемости (OS). С

целью ответа на этот вопрос проведен объединенный анализ с достаточно большим числом больных. Исследования в США, показали, что включение этой группы не ведет к ухудшению прогноза [132]. Вместе с тем, немецкие ученые получили противоположные результаты [129]. Следовательно, определение pCR, ассоциированной с наиболее благоприятным исходом, соответствует критериям уpT0 уpN0.

Общепринятых данных о том, что pCR может являться суррогатным маркером EFS или OS нет. Korn и соавторы не обнаружили подобной связи [133]. Напротив, в крупном мета-анализе 36 исследований у 5768 больных со стадиями I-III Her2-позитивным раком молочной железы подобная связь установлена [134]. В любом случае статистически достоверная связь между увеличением частоты pCR и увеличением продолжительности жизни не является столь очевидной и не означает, что ответ на лечение также является суррогатной мерой длительности выживания больных.

EFS или **бессобытийная выживаемость** определяется как время от рандомизации до прогрессирования болезни, заключающееся в невозможности проведения хирургического лечения, местных или отдаленных рецидивах и смерти по любым причинам [135]. Использование показателя EFS в исследованиях неoadьювантной терапии более предпочтительно, чем DFS. EFS может служить подходящей первичной точкой оценки эффективности для ускоренного признания лекарств при раке молочной железы, но ценность этого показателя как регуляторной конечной точки для традиционного применения должна быть продемонстрирована.

DFS (выживаемость без признаков заболевания) определяется как время от рандомизации до возобновления болезни или смерти от любых причин и часто используется как суррогатная конечная точка в исследованиях адьювантного лечения для оценки послеоперационного лечения (собственно хирургии или лучевой терапии) для стадий I, II, IIIa рака молочной железы. По данным Ng и соавторов [136] корреляция между 2-летними различиями в DFS и различиями в

5-летней OS не была достаточно сильной, чтобы считать DFS предиктором общей выживаемости.

Увеличение продолжительности жизни, то есть общей выживаемости (overall survival, OS) является одной из главных задач лечения рака молочной железы [137]. OS является однозначным критерием, но вместе с тем есть некоторые неудобства использования OS в качестве первичной конечной точки при метастатическом раке молочной железы: необходимость набора большого числа больных, длительное наблюдение до того как результаты станут доступными, а также использование различных методов терапии, которые могут влиять на OS. Эти ограничения особенно вызывают сложности при исследованиях терапии первой линии [138].

Агентства по изучению технологий здоровья (НТА) во всем мире признают **(выживаемость без прогрессирования)** в качестве конечной точки в клинических исследованиях [139]. Германский институт качества и эффективности здравоохранения (German Institute for Quality and efficiency in Health Care (IQWiG)) и Федеральный Объединенный комитет (Gemeinsamer Bundesausschuss, G-BA) не признают конечные точки, основанные на прогрессировании болезни в качестве исхода в оценке преимуществ тех или иных лекарств у больных, поскольку они измеряются методами визуализации (imaging techniques). Вместе с тем, подобные конечные точки могут быть приняты, если они взаимосвязаны с симптомами, испытываемыми больным. Очень важно, чтобы это не привело к тому, что будут опущены метастазы в ходе клинических испытаний, что считается неэтичным врачами и не соответствует клиническим рекомендациям [140]. Необходимо разработать возможные решения для этих различных требований.

Предложены методы валидации суррогатных конечных точек в контексте НТА [141] применили эти методы в индикации HR+, Her2-негативного метастатического рака молочной железы для валидации **PFS** (БП – выживаемость без прогрессирования) в качестве суррогатной конечной точки для OS.

Выживаемость без прогрессирования явилась наиболее информативным показателем в проведенном нами исследовании у больных раком молочной железы.

Это касалось клинических показателей, рецепторного статуса и молекулярных подтипов рака молочной железы.

В анализируемой нами группе больных у 75 пациенток поражение лимфатических узлов отсутствовало (N0), у 32 – соответствовало индексу N1. Разницы между группами не было в ОВ ($p=0,324$), БРВ ($p=0,322$) и ВБМ ($p=0,247$). Вместе с тем, выживаемость без прогрессирования у больных с индексом N1 была более низкой в сравнении с группой больных с индексом N0: лог-ранк тест – $p=0,112$; Бреслоу – $p=0,086$; Тарон-Уоре – $p=0,091$. При анализе группы больных, наблюдавшихся менее 55 мес., различия в выживаемости без прогрессирования достоверны ($p=0,029$). Как видно, в случаях вовлечения регионарных лимфатических узлов прогрессирование наступает в достаточно ранние сроки (менее 5 лет), и этот признак несмотря на то, что он не отражается на общей выживаемости, несомненно, должен учитываться при выборе тактики ведения больных.

Выживаемость без прогрессирования была существенно лучше при наличии эстрогенных рецепторов опухолевых клеток у больных, лог-ранк тест $p=0,007$; этот же показатель был информативен и при оценке выживаемости без метастазов ($p=0,026$). Наличие рецепторов прогестерона было менее информативным, чем наличие рецепторов эстрогенов в опухолевых клетках и влияло только на выживаемость без прогрессирования ($p=0,021$), но не на выживаемость без метастазов. Рецепторный статус (наличие рецепторов эстрогенов, прогестерона) не влиял на общую и безрецидивную выживаемость больных раком молочной железы. Следовательно, рецепторный статус (в особенности, наличие рецепторов эстрогенов) является фактором благоприятного прогноза при раке молочной железы, так как определяет группу благоприятного прогноза по выживаемости без прогрессирования.

При сравнении молекулярных подтипов рака молочной железы по выживаемости без прогрессирования получены достоверные различия по всем статистическим тестам. Наилучшими показателями характеризуются подтип с гиперэкспрессией Erb-B2, худшими – базальноподобный (трижды негативный) подтип. Достоверные различия имели место также по безрецидивной и безметастатической выживаемости. Вместе с тем, по общей выживаемости молекулярные подтипы рака молочной железы не различались. Это важный вывод нашей работы, заключающийся в том, что среднесрочная (5-7 лет) продолжительность жизни больных раком молочной железы не различается при молекулярных подтипах рака молочной железы, однако, эти подтипы достоверно различаются по выживаемости без прогрессирования, безрецидивной и безметастатической выживаемости. Совершенно очевидно, что установление того или иного признака прогрессии, без сомнения, ведет к назначению дополнительных лечебных воздействий, что позволяет справиться с этими грозными симптомами и увеличить продолжительность жизни больных. Однако современные лечебные подходы не являются безобидными для больного и в большинстве случаев ухудшают качество его жизни. Об этом важно помнить и стремиться к совершенствованию терапии, направленной на устранение причин прогрессирования рака молочной железы. Разумеется, более длительная прослеженность за больными может быть полезной в установлении влияния прогрессирования на общую выживаемость.

Полученные в нашей работе данные представляют несомненный интерес. Молекулярные типы рака молочной железы достоверно ассоциированы с прогнозом заболевания. Это касается, в первую очередь, показателей, связанных с прогрессированием заболевания и возникновением рецидивов и метастазов.

Показатели иммунной системы костного мозга также связаны с прогнозом заболевания, но это, в первую очередь, связь с общей выживаемостью. Именно общая выживаемость является эталоном эффективности терапии у больных раком молочной железы. И именно этот признак явился информативным, отражающим

связь с прогнозом субпопуляций лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы, как в целом по группе, так и при люминальных раках.

Действительно, возникновение рецидивов и метастазов заболевания после проведенного хирургического и иного лечения – это грозное, но не всегда фатальное событие. В ряде случаев современные методы химиотерапии и таргетной терапии позволяют справиться с симптомами прогрессирования и продлить жизнь больной. Это, в свою очередь, ведет к продлению продолжительности жизни (общей выживаемости), что может способствовать нивелированию различий в общей выживаемости у больных с прогрессией заболевания и без таковой.

Снижение общей выживаемости мы получили в случаях низкого содержания В-клеток костном мозге и их предшественников (CD10+, CD38+). Иными словами, сниженное содержание этих субпопуляций лимфоцитов в костном мозге ведет к ухудшению результатов лечения и более короткой продолжительности жизни больных. Аналогичное влияние отмечено для CD4-лимфоцитов, которые играют важную роль в реализации В-клеточного иммунного ответа.

Следует, однако, заметить, что одна из субпопуляций лимфоцитов костного мозга, а именно В1-клетки, была взаимосвязана с прогрессированием болезни. Низкие показатели В1-лимфоцитов ассоциировались с короткой выживаемостью без прогрессирования. Такими же проявлениями характеризовался тройной негативный вариант рака молочной железы – самый трудно поддающийся лечению вариант. Нами впервые установлена близкая к достоверной ассоциация уровня В1-лимфоцитов костного мозга с тройным негативным вариантом. Именно при этом варианте уровни В1-лимфоцитов были наиболее низкими. Возможно, это связано с дефицитом врожденных естественных антител к одному из опухолеассоциированных антигенов рака молочной железы (предстоит установить к какому). В этом случае возможна в качестве таргетной терапии адаптивная терапия естественными IgM-антителами.

Таким образом, оценка клеток иммунной системы костного мозга является одним из наиболее информативных показателей результативности лечения рака молочной железы. В первую очередь, информативными являются молекулярные подтипы рака, а также, учитываемые при их формировании рецепторы эстрогенов, прогестерона и Her2/neu. Из числа клинических факторов в нашем исследовании прогностической ролью (выживаемость без прогрессирования в сроки до 6 лет после операции) обладал факт вовлечения регионарных лимфатических узлов. Все эти факторы необходимо учитывать при проведении первичного лечения у больных раком молочной железы.

Совершенно новые данные получены о роли иммунологических показателей, то есть субпопуляций лимфоцитов костного мозга в прогнозе рака молочной железы. Именно эти параметры были взаимосвязаны с главным показателем результативности лечения – общей выживаемостью больных. Особую роль сыграли В-лимфоциты и их костномозговые предшественники. Оценка этих факторов, понимание их патогенетической роли необходимы в дальнейшем совершенствовании лечения больных раком молочной железы.

ВЫВОДЫ

1. В условиях современной комбинированной терапии рака молочной железы из числа клинических характеристик опухоли прогностическое значение имеет поражение регионарных лимфатических узлов. Достоверно более низкая выживаемость без прогрессирования у больных с индексом N+ в сравнении с N0 наблюдается в сроки до 55 мес ($p=0,029$) после операции.

2. Положительный статус рецепторов эстрогенов характеризует больных раком молочной железы с благоприятным прогнозом по показателям выживаемости без прогрессирования ($p=0,007$) и безметастатической выживаемости ($p=0,026$), статус рецепторов прогестерона – только по выживаемости без прогрессирования ($p=0,028$).

3. Главную роль в прогнозе рака молочной железы по безметастатической выживаемости и выживаемости без прогрессирования играют молекулярные подтипы опухоли ($p=0,005$), наиболее неблагоприятным является тройной негативный подтип ($p = 0,038$).

4. Субпопуляции В-лимфоцитов костного мозга играют роль в прогнозе рака молочной железы по общей выживаемости. Сниженные уровни В-клеток костного мозга (CD19), а также В-линейных предшественников (CD19+CD10+, CD19+CD38+) характеризуют группу больных с неблагоприятным прогнозом ($p = 0,019$). Прогностическая роль CD19+ клеток костного мозга имеет место и при люминальных раках.

5. Уровни В1-лимфоцитов (CD5+) костного мозга больных раком молочной железы взаимосвязаны с молекулярными подтипами опухоли ($p=0,039$), являются максимальными при варианте с гиперэкспрессией Erb-B2 и минимальными при тройном негативном подтипе.

6. Из числа Т- и НК-клеточных субпопуляций лимфоцитов костного мозга взаимосвязь с прогнозом имели только CD4-лимфоциты, низкие уровни которых были достоверно связаны с худшей общей выживаемостью больных ($p=0,028$). При длительных сроках наблюдения за больными (более 70 мес.) более

длительная выживаемость без прогрессирования наблюдалась у больных со сниженными уровнями костномозговых CD3-лимфоцитов ($p=0,08$).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БРВ – безрецидивная выживаемость
- ВБМ – безметастатическая выживаемость
- ВБП – выживаемость без прогрессирования
- ДОК – диссеминированные опухолевые клетки
- КМ – костный мозг
- ЛТ – лучевая терапия
- НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
- ОВ – общая выживаемость
- ОЛЛ- острый лимфобластный лейкоз
- ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
- ОССЮ – опухолями семейства саркомы Юинга
- ПКР – плоскоклеточный рак
- РМЖ – рак молочной железы
- рФНО – рецепторов фактора некроза опухоли
- рФРН – рецептора фактора роста нервов
- ТАА – туморассоциированных антигенов
- ХТ – химиотерапия
- ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты
- ER – рецепторы эстрогена
- HER2/neu – рецептор эпидермального фактора роста 2 типа
- Ki-67- индекс пролиферативной активности опухолевой клетки
- KIR– киллер-ингибирующие рецепторы
- НК – естественные киллерные клетки
- рCR – полный патоморфологический ответ
- RP – рецепторы прогестерона
- МНС – главный комплекс гистосовместимости
- T reg – регуляторные Т-клетки
- T х – Т-хелперы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 г. /А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петров// – М. МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2021.– 239с.
2. Артамонова, Е.В. Рак молочной железы: иммунологические факторы прогноза /Е.В. Артамонова, Н.А. Огнерубов, Н.Н. Тупицын, В.П. Летягин// Издательство Воронежского государственного университета. - 2005. – С. 236.
3. Müller, M. E. Tumor dormancy in bone marrow and lymph nodes: active control of proliferating tumor cells by CD8⁺ immune T cells/ M. Müller, F. Gounari, S. Prifti, H. J. Hacker, V. Schirmacher, K. Khazaie// American Association for Cancer Research. -1998. - Vol. 58, №23. - P. 5439–5446.
4. Andreoni, C. Phenotypic analysis of a large number of normal human bone marrow sample by flow cytometry/ C. Andreoni, D. Rigal, M. Bonnard [at al.] // Blut - 1990. – Vol. 61 – P. 271-277.
5. Van Oye, E.L. Research on the composition of the bone marrow in children. I. Normal myelogram / E.L. Van Oye // Revue belge de pathologie et de médecine expérimentale. – 1951. – Vol. 21, №4. - P. 355-369.
6. Малаховский, Ю.Е. О нормальной миелограмме у здоровых детей первых 3 лет жизни / Ю.Е. Малаховский // Проблемы гематологии. -1961.-№ 7 – С. 32-38.
7. Луговская, С.А. Лабораторная гематология/ С.А. Луговская, И.Т. Морозова, М.Е. Почтарь// – М. Тверь: ООО «Издательство». - 2006. –С. 214.
8. Луговская, С.А. Лабораторная диагностика лейкозов/ С.А. Луговская, И.Т. Морозова, М.Е. Почтарь // – М. Тверь: Информационно-издательская фирма «Губернская медицина». - 2000. – С. 214.
9. Козинец, Г.И. Исследование системы крови в клинической практике / Г.И. Козинец и В.А. Макарова // М. «Триада-Х». - 1998- С. 41-43.
10. Гривцова, Л.Ю. Морфологические и иммунологические особенности стимулированного Г-КСФ аутологичного и аллогенного костного мозга,

применяемого для трансплантации в клинической онкологии/ Л.Ю. Гривцова, Т.З. Чернявская, К.Н. Мелкова, О.П. Колбацкая, В.Ю. Сельчук, Н.Н. Тупицын [и др.] // Профилактика, диагностика и лечение онкологических заболеваний. - 2018. –Т.8. -№1. –С.22-29.

11. Абакушина, Е.В. Основные свойства и функции NK-клеток человека / Е.В. Абакушина, Е.Г. Кузьмина, Е.И. Коваленко // Иммунология. – 2012. – Т. 33, № 4. – С. 220-224.

12. DiRosa, F. The bone marrow: a nest for migratory memory T-cells / F. DiRosa, R.Pabst // Trends Immunol. - 2005. - Vol.26. - P. 360-366.

13. Okhrimenko, A. Human memory T-cells from the bone marrow are resting and maintain long-lasting systemic memory/ A. Okhrimenko, J. R. Grün, K. Westendorf, Z. Fang, S. Reinke, P. Roth, G. Wassilew, A.A. Köhl, R. Kudernatsch [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. - 2014. - Vol.111, №25.-P. 9229-9234.

14. Tokoyoda, K. Professional memory CD4+ lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow / K. Tokoyoda, S. Zehentmeier, A. N. Hegazy, I. Albrecht, J. R. Grün, M. Löhning [et al.] // Immunity. -2009. - Vol.30, №5. - P. 721-730.

15. Tokoyoda, K. Organization of immunological memory by bone marrow stroma / K. Tokoyoda, A.E. Hauser, T. Nakayama, A. Radbruch // Nature reviews. Immunology. - 2010.-Vol.10, №3.- P.193–200.

16. Tokoyoda, K. Professional memory CD4+ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow / K. Tokoyoda, S. Zehentmeier, A.N. Hegazy [et al.] // Immunityю - 2009. - Vol.30, №5. - P. 721–730.

17. Mazo, I.B. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T-cells/ I.B. Mazo, M. Honczarenko, H. Leung, L. L. Cavanagh, R. Bonasio, W. Weninger, K. Engelke [et.al.]// Immunity. - 2005.- Vol.22.- P.259-270.

18. Zhang, X. Human Bone Marrow: A Reservoir for “Enhanced Effector Memory” CD8+ T Cells with Potent Recall Function/ X. Zhang, H. Dong, W. Lin,

S.Voss, L.Hinkley, M.Westergren, G.Tian, D. Berry, D. Lewellen [et al.]// *Journal of immunology.*- 2006.-Vol.177.-P.6730–6737.

19. Merckenschlager, M. Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by monoclonal antibody UCHL-1: implications for differential CD45 expression in T-cell memory formation/ M. Merckenschlager, L. Terry, R. Edwards [et al.]// *European Journal of Immunology.* - 1988.-Vol 18.-P. 1653-1661.

20. Akbar, A.N. Loss of CD45R and gain of UCHL-tivity is a feature of primed T-cells / A.N. Akbar, L.Terry, A. Timms [et al.] // *J. Immunol.*- 1988. – Vol. 140. – P. 2171-2178.

21. Forster, R. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs/ R. Förster, A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Müller, E.Wolf, M. Lipp // *Cell.* - 1999. Vol. 99, №1.- P. 23-33.

22. Sallusto, F. Two subsets of memory T-lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions/ F. Sallusto, D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, A. Lanzavecchia// *Nature.* -1999.- Vol. 401.- P.708-712.

23. Chang, H.D. Immunological memory of the bone marrow/ H.D. Chang, K. Tokoyoda, A. Radburch// *Immunological reviews.* - 2018.- Vol.283.- P.86-98.

24. Mousset, C.M. Comprehensive immunophenotyping of T-cells using flow cytometry/ M. Mousset, W. Hobo, R. Woestenenk, F. Preijers, H. Dolstra// *Cytometry Part A.*- 2019.- Vol.95, №6.-P. 647-654.

25. Pierini A. Foxp3⁺ regulatory T cells maintain the bone marrow microenvironment for B cell lymphopoiesis/ A.Pierini, H.Nishikii, J.Baker, T.Kimura, H.Kwon, Y.Pan, Y. Chen, M. Alvarez [et al.]// *Nature Communications.* - 2017. - Vol. 8. –P.1-13.

26. Quinci, A. C. IL-15 inhibits IL-7R α expression by memory-phenotype CD8⁺T cells in the bone marrow/ A. C. Quinci, S.Vitale, E. Parretta, A.Soriani, M.L. Iannitto, M.Cippitelli, C.Fionda, S.Bulfone-Paus [et al.] // *European Journal of Immunology.* – 2012. - Vol. 42, № 5. - P.1129–1139.

27. Kudernatsch, R. F. Human bone marrow contains a subset of quiescent early memory CD8⁺T cells characterized by high CD127 expression and efflux capacity/ R.F. Kudernatsch, A. Letsch, M. Guerreiro, M. Löbel, S. Bauer [et al.] // *European Journal of Immunology*. - 2014. - Vol.44, №12. - P.3532–3542.
28. Mei, H.E. A unique population of IgG-expressing plasma cells lacking CD19 is enriched in human bone marrow/ H.E. Mei, I. Wirries, D. Frölich, M. Brisslert, C. Giesecke, J.R. Grün, T. Alexander [et. al.] // *Blood*. -2015.- Vol.125.-P.1739-1748.
29. Pabst, R. The bone marrow is not only a primary lymphoid organ: the critical role for T-lymphocyte migration and housing of long-term memory plasma cells / R. Pabst // *European Journal of Immunology*. - 2018.- Vol. 48.-P.1096-1100.
30. Mazo, I.B. Adhesion and homing of blood borne cells in bone marrow microvessels / I.B. Mazo, U.H. von Andrian // *Journal of Leukocyte Biology*. – 1999. – Vol.66.- P.25–32.
31. Mercier, F.E. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity / F.E. Mercier, C. Ragu, D. T. Scadden // *Nature Reviews. Immunology*. -2012.-Vol. 12, №1.- P. 49–60.
32. Di Rosa, F. Bone marrow T cells and the integrated functions of recirculating and tissue-resident memory T cells / F. Di Rosa, T. Gebhardt // *Front Immunology*. -2016.- P.7-51.
33. Di Rosa, F. Bone marrow CD8 T cells are in a different activation state than those in lymphoid periphery / F. Di Rosa, F. Santoni // *European Journal of Immunology*. - 2002. - Vol. 32. - P. 1873-1880.
34. Di Rosa, F. Memory T-cell competition for bone marrow seeding/ F. Di Rosa, A. Santoni // *Immunology*. -2003. - Vol.108. - P.296-304.
35. Pabst, R. Organ distribution and fate of newly formed splenic lymphocytes in pigs / R. Pabst, E. N. Anat // *Anatomical record*. -1982.- Vol.202, №1.- P. 85-94.
36. Pabst, R. Proliferation and emigration of newly formed lymphocyte from pig spleens during an immune response / R. Pabst, K. Pötschick // *Immunology*. - 1983.- Vol.50, №2.-P.281–288.

37. Feuerer, M. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen / M. Feuerer, P. Beckhove, N. Garbi [et al.] // *Nature Medicine*. -2003.- Vol.9, № 9.- P. 1151-1157.
38. Bai, L. Cognate interactions between memory T cells and tumor antigen-presenting dendritic cells from bone marrow of breast cancer patients: bidirectional cell stimulation, survival and antitumor activity in vivo / L. Bai, P. Beckhove, M. Feuerer, V. Umansky, C. Choi, F.S. Solomayer [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2003. - Vol.103. - P.73–83.
39. Cavanagh, L.L. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells / L.L. Cavanagh, R. Bonasio, I.B. Mazo [et al.] // *Nature Immunology*.- 2005.- Vol. 6, N. 10. - P. 1029–1037.
40. Milo, I. Dynamic imaging reveals promiscuous crosspresentation of blood-borne antigens to naive CD8+ T cells in the bone marrow / I. Milo, A. Sapozhnikov, V. Kalchenko [et al.] // *Blood*. - 2013.-Vol.122.- P.193–208.
41. Schirmacher, V. T-cell priming in bone marrow: the potential for long-lasting protective anti-tumor immunity / V. Schirmacher, M. Feuerer, P. Fournier, T. Ahlert, V. Umansky, Ph. Beckhove // *Trends in molecular medicine*.-2003.- Vol.9, №12.-P.526-534.
42. Wu, K. CD4 TSCMs in the bone marrow assist in maturation of antibodies against influenza in mice/ K. Wu, F. Wang, G. Guo, Y. Li, L. Qiu, X. Li// *Mediators of inflammation*. - 2019.- article ID 3231696.
43. Alp, Ö.S. Memory CD8+ T cells colocalize with IL-7+ stromal cells in bone marrow and rest in terms of proliferation and transcription / Ö.S. Alp, S. Durlanik, D. Schulz, M. McGrath, J.R. Grün, M. Bardua, K. Ikuta, E. Sgouroudis, R. Riedel [et al.] // *European Journal of Immunology*.-2015.- Vol. 45, №4.- P.975–987.
44. Tokoyoda, K. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development / K. Tokoyoda, T. Egawa, T. Sugiyama, B. Choi, T. Nagasawa // *Immunity*. - 2004.- Vol. 20, № 6.-P. 707–718.
45. Chenery, A.L. Chronic *Trichuris muris* infection alters hematopoiesis and causes IFN γ -expressing T-cell accumulation in the mouse bone marrow / A.L.

Chenery, F. Antignano, M.R. Hughes [et al.] // *European Journal of Immunology*. - 2016. - Vol. 46. - P. 2587–2596.

46. Guerreiro, M. Human peripheral blood and bone marrow Epstein-Barr virus-specific T-cell repertoire in latent infection reveals distinct memory T-cell subsets / M. Guerreiro, I.K. Na, A. Letsch, D. Haase, S.Bauer, C. Meisel [et al.] // *European Journal of Immunology*.-2010.-Vol.40, №6.- P.1566-1576.

47. Palendira, U. Selective accumulation of virus-specific CD8 T cells with unique homing phenotype within the human bone marrow / U. Palendira, R.Chinn, W. Raza, K. Piper, G. Pratt, L. Machado, A.Bell, N. Khan, A.D. Hislop [et al.] // *Blood*.-2008.- Vol.112, №8.-P.3293-3302.

48. Parretta, E. CD8 cell division maintaining cytotoxic memory occurs predominantly in the bone marrow / E. Parretta, G.Cassese, P.Barba, A.Santoni, J. Guardiola, F. Di Rosa // *Journal of immunology*.- 2005.- Vol.174, №12.- P.7654–7664.

49. Parretta, E. CD8 cell division maintaining cytotoxic memory occurs predominantly in the bone marrow / E. Parretta, G. Cassese, P. Barba, A.Santoni, J. Guardiola, D. Rosa // *Journal of Immunology*.-2005.- Vol. 174, №12.- P. 7654–7664.

50. Slifka, M.K. Bone marrow contains virus-specific cytotoxic T lymphocytes / M. K. Slifka, J. K. Whitmire, R. Ahmed // *Blood*. - 1997.-Vol.90.- P.2103-2108.

51. Wu, K. Preferential homing of tumor-specific and functional CD8+ stem cell-like memory T cells to the bone marrow / K. Wu, Y. Li, Sh. Zhang, N. Zhou, B. Liu, T. Pan, X. Zhang, H. Luo [et al.] // *Journal of immunotherapy*. - 2019.- Vol. 42.- P.197-207.

52. Zhao, E. Bone marrow and the control of immunity / E. Zhao, H. Xu, L.Wang, I.Kryczek, K.Wu, Y. Hu, G. Wang, W. Zou // *Cellular and molecular immunology*.- 2012. - Vol.9, №1.-P.11-19.

53. Wood, A.H. CD8+ memory T lymphocytes from bone marrow immune function and therapeutic potential / A.H. Wood, X. Zhang, D.L. Farber, S.E. Strome // *Critical reviews in immunology*. -2007. – Vol.27, №6.- P.527–537.

54. Borek, C. Long-lived plasma cells. In Rathcliffe J.H. (ed.) / C. Borek, R.A. Manz // *Encyclopedia Immunobiology*. Academic press, London. - 2016.-Vol.3. - P. 200-207.
55. Fu, Y. Development and maturation of secondary lymphoid tissues / Y. Fu, D.D. Chaplin // *Annual Review of Immunology*. - 1999. - Vol.17. - P.399–458.
56. Banchereau, J. Immunobiology of dendritic cells / J. Banchereau [et al.] // *Annual Review of Immunology*. – 2007- Vol.18.- P.767–811.
57. Lanzavecchia, A. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics / A. Lanzavecchia, F. Sallusto // *Current Opinion in Immunology*. -2001.- Vol.13, №3. – P. 291-298.
58. Koni, P.A. Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow / P.A. Koni, S.K. Joshi, U. A. Temann, D. Olson, L. Burkly, R.A. Flavell // *Journal of Experimental Medicine*. -2001.- Vol.193, №6.-P. 741–753.
59. Feuerer, M. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. / M. Feuerer, M. Rocha, L. Bai [et al.] // *Int. J Cancer*. – 2001. -Vol.92, №1. –P. 96–105.
60. Khazaie, K. Persistence of dormant tumor cells in the bone marrow of tumor cell vaccinated mice correlates with long-term immunological protection / K. Khazaie, S. Prifti, P. Beckhove, A. Griesbach, S. Russell, M. Collins, V. Schirmacher // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*.-1994.- Vol.91,№16.-P. 7430–7434.
61. Kuroda, M.J. Simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes and cell-associated viral RNA levels in distinct lymphoid compartments of SIV mac-infected rhesus monkeys / M.J. Kuroda, J.E. Schmitz, A. Seth, R.S. Veazey, C.E. Nickerson, M.A. Lifton, P.J. Dailey [et al.] // *Journal of the American Society of Hematology*. – 2000.-Vol.96, №4.- P.1474–1479.
62. Marshall, D.R. Measuring the diaspora for virus-specific CD8+ T cells/ D.R. Marshall, S.J. Turner, G.T. Belz, S. Wingo, S. Andreansky, M.Y. Sangster, J.M.

Riberdy, T. Liu, M. Tan, P.C. Doherty // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* - 2001. - Vol.98, №11- P. 6313-6318.

63. Domschke, C. Long-term survival after adoptive bone marrow T cell therapy of advanced metastasized breast cancer: follow-up analysis of a clinical pilot trial / C. Domschke, Y. Ge, I. Bernhardt [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy.* -2013. - Vol.62, N.6.- P.1053-1060.

64. Feuerer, M. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow / M. Feuerer, P. Beckhove, L. Bai, E.F. Solomayer, G. Bastert, I.J. Diel, C. Pedain [et al.] // *Nature Medicine.* -2001. - Vol. 7, №4. - P.452–458.

65. Noonan, K.A. Adoptive transfer of activated marrow-infiltrating lymphocytes induces measurable antitumor immunity in the bone marrow in multiple myeloma / K.A. Noonan, C.A. Huff, J. Davis, M.V. Lemas, S. Fiorino, J.Bitzan, A. Ferguson, A. Emerling, L. Luznik, W.Matsui [et al.] // *Science translational medicine.* -2015.- Vol.7, №288.- P.288ra78.

66. Fresnay, S. Bone marrow vaccination: a novel approach to enhance antigen specific antitumor immunity / S. Fresnay, X. Zhang, S.E. Strome [et al.] // *Vaccine.* - 2011.- Vol.29, №47.-P. 8599-8605.

67. Tobias, J.D. Intraosseous infusions: a review for the anesthesiologist with a focus on pediatric use / J.D. Tobias, A.K. Ross // *Anesthesia and analgesia.* - 2010.- Vol.110. – P.391–401.

68. Kushida, T. Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice / T. Kushida, M. Inaba, H. Hisha, N. Ichioka, T. Esumi [et al.] // *Journal of the American Society of Hematology.* – 2001.- Vol.97.- P. 3292–3299.

69. Zeng, D. Unique patterns of surface receptors, cytokine secretion, and immune functions distinguish T cells in the bone marrow from those in the periphery: impact on allogeneic bone marrow transplantation / D. Zeng, P. Hoffmann, F. Lan, Ph. Huie, J. Higgins, S. Strober // *Blood.*- 2002.-Vol.99.-P.1449-1457.

70. Тупицын, Н.Н. Структура и функции иммунной системы человека. Клиническая онкогематология / Н.Н. Тупицын // Руководство для врачей под редакцией проф. М.А. Волковой. - М. «Медицина» - 2007.

71. Sugiyama, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches / T. Sugiyama, H. Kohara, M. Noda, T. Nagasawa // Immunity. - 2006.-Vol.25, №6.-P. 977–988.

72. Letsch, A. Bone marrow contains melanoma-reactive CD8 effector T cells and, compared with peripheral blood, enriched numbers of melanoma-reactive CD8 memory T cells / A. Letsch, U. Keilholz, G. Assfalg, V. Mailander, E. Thiel, C. Scheibenbogen // Cancer Research. - 2003.- Vol. 63.-P.5582-5586.

73. Müller-Berghaus, J. Melanoma-reactive T cells in the bone marrow of melanoma patients: association with disease stage and disease duration / J. Müller-Berghaus, K. Ehlert, S. Ugurel, V. Umansky, M. Bucur, V. Schirmacher [et al.] // American Association for Cancer Research. – 2006. – Vol. 66, №12 – P. 5997-6001.

74. Murao, A. High frequencies of less differentiated and more proliferative WT1-specific CD8+ T cells in bone marrow in tumor-bearing patients: an important role of bone marrow as a secondary lymphoid organ / A. Murao, Y.Oka, A. Tsuboi, O.A. Elisseeva, Y.Tanaka-Harada, F. Fujiki, H. Nakajima [et al.] // Cancer science. - 2010. – Vol.101, №4. – P.848–854.

75. Schmitz-Winnenthal, F.H. High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients / F.H. Schmitz-Winnenthal, C. Volk, K. Z'graggen, L. Galindo, D. Nummer, Y. Ziouta, M. Bucur, J. Weitz // Cancer research. – 2005. – Vol. 65, № 21 – P.10079-10087.

76. Sommerfeldt, N. The shaping of a polyvalent and highly individual T-cell repertoire in the bone marrow of breast cancer patients / N.Sommerfeldt, F. Schütz, Ch.Sohn, J.Förster, V.Schirmacher, Ph. Beckhove // Cancer research. – 2006. – Vol. 66, №16 – P. 8258-8265.

77. Fauci, A. Distribution of lymphocyte subpopulations in the bone marrow of normal individuals / A. Fauci, J. Clin // Investigation. – 1975. – Vol.56. – P. 98-110.

78. Schuetz, F. Treatment of advanced metastasized breast cancer with bone marrow-derived tumour-reactive memory T cells: a pilot clinical study / F. Schuetz, K. Ehlert, Y. Ge, A. Schneeweiss, J. Rom, N. Inzkirweli, Ch. Sohn, V. Schirmacher, Ph. Beckhove // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. - 2009. - Vol.58. – P.887–900.

79. Fisch, P. Gamma/delta T cell clones and natural killer cell clones mediate distinct patterns of non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity / P. Fisch, M. Malkovsky, E. Braakman [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 1990. – Vol. 171, № 5 – P. 1567-1579.

80. Gober, H.J. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells / H.J. Gober, M. Kistowska, L. Angman [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2003 – Vol. 197, № 2 – P. 163-168.

81. Grau, R. Cytotoxic activity of natural killer cells lacking killer-inhibitory receptors for self-HLA class I molecules against autologous hematopoietic stem cells in healthy individuals / R. Grau, K. S. Lang, D. Wernet, P. Lang, D.Niethammer, C. M. Pusch [et al.] // *Experimental and Molecular Pathology*. - 2004 – Vol. 76, №2 – P. 90-98.

82. Shevach, E.M. Regulatory T cells in autoimmunity/ E. M. Shevach, A. M. Thornton// *Immunological reviews*. - 2000. - Vol. 18 – P. 423-449.

83. Diefenbach, A. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity / A. Diefenbach, D.H. Raulet // *Immunological Reviews*. – 2002. – Vol. 188. – P. 9-21.

84. Groh, V. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ -T cells of MIC-A and MIC-B / V.Groh, R. Rhienehart, H. Secrist [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. -1999. – Vol.96. – P.6879-6884.

85. Halary, F. Shared reactivity of V δ 2neg $\gamma\delta$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells / F. Halary, V. Pitard, D. Dlubek, R. Krzysiek, H. de la Salle, P. Merville, C.Dromer [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2005. - Vol. 201, №10. - P. 1567-1578.

86. Kabelitz, D. Perspectives of T cells in tumor immunology / D. Kabelitz, D. Wesch, W. He. // *Cancer Research* – 2007. -Vol. 67. - P. 5-8.
87. Banat, G.A. Immune and inflammatory cell composition of human lung cancer stroma. / G.A. Banat, A. Tretyn, S.S. Pullamsetti [et al.] // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 9, №10. - e0139073.
88. Cho, D. Cytotoxicity of activated natural killer cell against pediatric solid tumors / D. Cho, D. Shook, N. Shimasaki et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2010. – Vol.16. - P.3901-3009.
89. Brinkrolf, P. A high proportion of bone marrow T cells with regulatory phenotype (CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺) in Ewing sarcoma patients is associated with metastatic disease / P. Brinkrolf, S. Landmeier, B. Altvater [et al.] // *International Journal of Cancer* – 2009 – Vol. 125, №4. – P. 879-886.
90. Фрейдлин, И.С. Иммуные комплексы и цитокины / И.С. Фрейдлин, А.А. Тоголян // *Медицинская иммунология*. – 1999. - Т. 1, № 1 – 2. - С.27 – 36.
91. Велижева, Н.М. Влияние Т-регуляторных клеток на киллерные свойства активированных лимфоцитов / Н.М. Велижева // *Диссертацию на соискание ученой степени кандидата наук РАМН РОНЦ им. Н.Н. Блохина*. – 2011. – P. 21-33.
92. Горбунова, Т.В. Анализ клинически значимых субпопуляций лимфоцитов костного мозга у детей при рабдомиосаркоме и ОССЮ / Т.В. Горбунова, В.Г. Поляков, Т.В. Шведова [и др.] // *Иммунология гемопоеза*. – 2013. – Т. 11, №1-2. –С.32-71.
93. Горбунова, Т.В. Клиническое значение анализа субпопуляций лимфоцитов костного мозга при рабдомиосаркоме и опухолях семейства саркомы Юинга у детей / Т.В. Горбунова, В.Г. Поляков, Н.Н. Тупицын [и др.]// *Онкопедиатрия*. – 2014. – № 2. – С. 27-36.
94. Горбунова, Т.В. Сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга у детей при мелкоклеточных саркомах / Т.В. Горбунова, В.Г. Поляков, Т.В. Шведова [и др.] // *Иммунология*. – 2012. – Т. 33, № 1. – С. 37-44.

95. Джуманазаров, Т.М. Иммунологическая характеристика костного мозга у больных немелкоклеточным раком легкого / Т.М. Джуманазаров // автореферат дис. канд.мед. наук.-2021.- С.121-130.
96. Sarah, L.B. The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy / L.B. Sarah, A. Rogel, A. Al-Shamkhani // - 2018. – Vol.131, №1. –P. 35-49.
97. DeBarros, A. CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human $\alpha\beta$ peripheral blood lymphocytes / A. DeBarros, M. Chaves-Ferreira, F. d'Orey [et al.]// European Journal of Immunology. -2011. –Vol.41, №1. - P.195-201.
98. Han, B.K. The CD27- CD70 pathway and pathogenesis of autoimmune disease / B.K. Han, N.J. Olsen, A. Bottaro // Seminars in Arthritis and Rheumatism. – 2016. –Vol.45, №4. – P.496-501.
99. Черткова, А.И. Эффекторные и регуляторные Т-лимфоциты периферической крови больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом: связь с клиническим эффектом химиотерапии / А.И. Черткова, Е.Г. Славина, М.А. Окружная [и др.] // Вестник ФГБУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина". – 2016. – Т.27, №2. – С. 89–97.
100. Liu, C. Smoking history influences the prognostic value of peripheral naive CD4+ T cells in advanced non-small cell lung cancer / C. Liu, B. Xu, Q. Li et al.// International Journal of Cancer. - 2019. –Vol.19, №176. - P. 899-906.
101. Solomayer, E.F. Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analysed in the bone marrow of patients with breast cancer / E.F. Solomayer, M. Feuerer, L. Bai [et al.] // Clinical Cancer Research. - 2003. –Vol.9, №1. - P. 174-80.
102. Григорьева, Т. А. Субпопуляции лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы / Т.А. Григорьева, О.А. Безнос, Н.Н. Тупицын [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2015. – Т.11, № 2. – С. 52-55.
103. Мкртчян, В.А. Взаимосвязь между НК-клетками костного мозга больных раком молочной железы и биологическими особенностями опухоли и

эритропозом / В.А. Мкртчян, И.К. Воротников, О.А. Чернышева [и др.] // Онкогинекология. – 2019. - №3. – С. 4-13.

104. Apetoh, L. Consensus nomenclature for CD8+ T cell phenotypes in cancer / L. Apetoh, M.J. Smyth, C.G. Drake [et al.] // Oncoimmunology. – 2015. - Vol.4, №4. – e998538.

105. Lu, L. Generation and regulation of CD8+ regulatory T cells / L. Lu, H. Cantor // Journal of Cellular and Molecular Immunology. -2008. –Vol.5, №6. –P. 401-406.

106. Filaci, G. CD8+ CD28-T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers / G. Filaci, D. Fenoglio, M. Fravega [et al.] // J Immunol. – 2007. -Vol.179, №7. –P. 4323-34.

107. Karagoz, B. CD8+CD28- cells and CD4+CD25+ regulatory T-cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients / B. Karagoz, O. Bilgi, M. Gumus [et al.] // Medical Oncology.– 2010. -Vol.27, №1. – P.29-33.

108. Кадагидзе, З.Г. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественной меланомой и раком молочной железы / З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова, Т.Н. Заботина и др. // Иммунология. – 2014. – Т. 2, № 35. – С. 64-67.

109. Liu, C. Prognostic significance of peripheral CD8+CD28+ and CD8+CD28- T cells in advanced non-small cell lung cancer patients treated with chemo(radio) therapy/ C. Liu, W. Jing, N. An [et al.] // Journal of Translational Medicine. -2019. –Vol.17, №344. - P. 2097-2107.

110. Liu, C. Increased CD8+CD28+ T cells independently predict better early response to stereotactic ablative radiotherapy in patients with lung metastases from non-small cell lung cancer / C. Liu, Q. Hu, K. Hu [et al.] // Journal of Translational Medicine. - 2019. – Vol.17, №120. - P. 1872-1879.

111. Кадагидзе, З.Г. Иммунная система и рак / З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова // Практическая онкология. - 2016. - Т. 17, №2. - С. 62-73.

112. Whiteside T.L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth / T.L. Whiteside // Oncogene. - 2008. – Vol.27, №45. - P. 5904-5912.

113. Абакушина, Е.В. Основные свойства и функции НК-клеток человека / Е.В. Абакушина, Е.Г. Кузьмина, Е.И. Коваленко // Иммунология. – 2012. – Т. 33, № 4. – С. 220-224.
114. Terabe M. Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity /M. Terabe, JA. Berzofsky // *Frontiers in Immunology*. – 2018. -Vol.9.-P. 1838-1849.
115. Татарский, В.В. Липоапоптоз: механизм программируемой гибели клеток при действии липидов / В.В. Татарский // *Иммунология гемопоеза*. –2017. – №2.–С. 33-51.
116. Lianny, Q. Functionally Impaired Follicular Helper T Cells Induce Regulatory B Cells and CD14 + Human Leukocyte antigen-DR - Cell Differentiation in Non-Small Cell Lung Cancer / Q. Lianny, Y. Qinhu, Z. Yonglie [et al.] // *Cancer Science*. - 2018. –Vol.109, №12. –P. 3751-3761.
117. Capietto, A.H. Immune regulation of bone metastasis. / A.H. Capietto, R. Faccio // *BoneKey Reports* -2014. -Vol.3. - P- 600.
118. Takeuchi, A. CD4 CTL a cytotoxic subset of CD4+ T-cells, their differentiation and function / A. Takeuchi, T. Saito // *Frontiers in immunology*. – 2017. -Vol.8, №194.-P.1-13.
119. Мкртчян, В.А. Иммунофенотипическая характеристика клеток врожденного иммунитета костного мозга больных раком молочной железы: автореф. дис.канд. мед. наук: 3.1.6. / Мкртчян Вануи Артаковна; [Место защиты: НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина РАМН]. – Москва, 2022. -С.14-21.
120. Крохина, О.В. Иммуноцитологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг / О.В. Крохина, В.П. Летягин, Н.Н. Тупицын [и др.] // *Иммунология гемопоеза*. –2007. – Т. 4, № 2.– С. 116-131.
121. Колбацкая, О.П. Субпопуляции лимфоцитов костного мозга у больных острым лейкозом при диагностике/ О.П. Колбацкая, Н.Н. Тупицын [и др.] // *Иммунология гемопоеза*. - 2012.- Т. 10, №2. – С. 77-89.
122. Грабовой, А.Н. Гистологическая оценка ответа опухоли на химиолучевую терапию / А.Н. Грабовой, Т.О. Тарасова, М.В. Кошубарова // *Клиническая онкология*. — 2012. — Т. 6, No 2. — С. 138-143.

123. Lakhari, S.R. World Health Organization classification of tumours of the breast / S.R. Lakhari, I.O. Ellis, S.J. Schnitt, P.H. Tan (Eds.)// — Lyon: IARC. - 2012. — P. 240.

124. Wolff, A.C. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: ASCO/CAP clinical practice guideline update / A.C. Wolff, E.H. Hammond, D.G. Hicks [et al.] // Journal of Experimental Medicine — 2013. — Vol. 31, №31. — P. 3997-4014.

125. Bose, A. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients // A. Bose, T. Chakraborty, K. Chakraborty [et al.] // Cancer Immunity. — 2008. - Vol 8, №1. — P.10.

126. Бердова, Ф.К. Молекулярные подтипы и иммунная система костного мозга в прогнозе рака молочной железы / Ф.К.Бердова, Т.А. Григорьева, И.К.Вортников, Н.Н.Тупицын// Российский биотерапевтический журнал.- .— 2022. — Т. 21, №2. — С. 40-46

127. Бердова Ф.К. Субпопуляции В-лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы в прогнозе заболевания// Ф.К.Бердова, И.К.Вортников, Н.Н.Тупицын// Российский биотерапевтический журнал. —2022. — Т. 21, №1. — С. 50-56

128. Бердова, Ф.К. Т- и НК-клеточные субпопуляции лимфоцитов костного мозга в прогнозе рака молочной железы/ Ф.К.Бердова, И.К.Вортников, Н.Н.Тупицын// Онкогинекология. — 2022. — №1. — С. 16-25.

129. Minckwitz, G. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes / G. Minckwitz, M. Untch, J. Blohmer, S.D. Costa, H. Eidtmann, P.A. Fasching, B. Gerber [et al.]// Journal of clinical oncology.-2012.-Vol.30, №15.-P.1796–1804.

130. Minckwitz, G. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer / G. Minckwitz, H. Eidtmann, M. Rezai, P.A. Fasching, H. Tesch, H. Eggemann, I. Schrader, K. Kittel, C. Hanusch [et al.]//The New England journal of medicine. -2012.-Vol.366,№4.-P.299–309.

131. Baselga J. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTT0): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial / J. Baselga, I. Bradbury, H. Eidtmann, S.D. Cosimo, E. Azambuja, C. Aura, H. Gómez [et al.]// London lancet. -2012.-Vol.379.-P.633–640.

132. Mazouni, C. Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome / C. Mazouni, F. Peintinger, Sh.Wan-Kau, F.Andre, A.M. Gonzalez-Angulo, W.F. Symmans, F. Meric-Bernstam [et al.]// Journal of clinical oncology.-2007.-Vol.25.-P.2650–2655.

133. Korn, E.L. Statistical controversies in clinical research: assessing pathologic complete response as a trial level surrogate end point for early-stage breast cancer / E.L. Korn, M.C. Sachs, L.M. McShane // Annals of oncology.-2016.-Vol.27.-P.10–15.

134. Broglio, K.R. Association of pathologic complete response to neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer with long-term outcomes: a meta-analysis / K.R. Broglio, M. Quintana, M. Foster, M. Olinger, A. McGlothlin, S.M. Berry, J.Boileau, Ch. Brezden-Masley // JAMA oncology.-2016.- Vol. 2.-P.751–760.

135. Clinical trial endpoints for the approval of cancer drugs and biologics: guidance for industry // U.S. Department of Health and Human Services. – 2018. – P.7-11.

136. Pond, Ng.R. Correlation of changes between 2-year disease-free survival and 5-year overall survival in adjuvant breast cancer trials from 1966 to 2006 / R.Ng. Pond, P.A. Tang, P.W. MacIntosh, L.L. Siu, E.X. Chen // Annals of oncology.-2008.-Vol.19.-P. 481–486.

137. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Version 4.0, 2017 AWMF Registernummer: 032-045OL. <https://www.leitlinienprogrammmonkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>. Accessed 26 July 2018.

138. Leo, A.D. Overall survival is not a realistic end point for clinical trials of new drugs in advanced solid tumors: a critical assessment based on recently reported phase III trials in colorectal and breast cancer / A.D. Leo, H. Bleiberg, M. Buyse // *Journal of clinical oncology*. -2003.- Vol.21, №10.- P.2045–2047.

139. Chabot, I. Oncology drug health technology assessment recommendations: Canadian versus UK experiences / I. Chabot, A. Rocchi // *Clinico Economics and outcomes research*. - 2014.- Vol.6.- P. 357–367.

140. Thill, M. AGO recommendations for the diagnosis and treatment of patients with advanced and metastatic breast cancer: update 2017 / M. Thill, C. Liedtke, E. Solomayer, V. Müller, W. Janni, M. Schmidt // *Breast Care*.- 2017. -Vol.12, №3. - P.184–191.

141. Lux, M.P. Surrogate threshold effect based on a meta-analysis for the predictive value of progression-free survival for overall survival in hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer // M.P. Lux, S. Bohme, S. Hucherrig [et al.] // *Breast cancer research and treatment*. – 2019. – Vol.176. - P.495-506.