

БЕРДОВА ФАРАНГИЗ КАРАМШОЕВНА

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

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Тупицын Николай Николаевич

Официальные оппоненты:

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

Гривцова Людмила Юрьевна, доктор биологических наук, заведующая отделом лабораторной медицины и лабораторией клинической иммунологии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба - филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «21» декабря 2023 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

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

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

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

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

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.

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.

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

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. Известны особенности ряда звеньев врожденного Т-клеточного иммунитета при опухолях. И, наконец, роль NK-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 раке молочной железы.
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 рака молочной железы и изучить их связь с клинико-морфологическими и иммуногистохимическими характеристиками опухолей.
4. Сопоставить взаимосвязь субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга с молекулярными подтипами рака молочной железы.

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. Костный мозг для исследования получен методом стерильной пункции. Исследования проведены у больных, которые до операции не получали лучевую терапию, химиотерапию или гормонотерапию.

Изучение костного мозга проведено на базе лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с использованием двух методов: морфологического и иммунологического. Морфологическая оценка костного мозга выполнена с использованием световой микроскопии, 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 $p < 0,05$.

Научная новизна

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.

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

Полученные в исследовании данные имеют важное практическое и теоретическое значение, поскольку связь субпопуляций лимфоцитов с прогнозом (общей выживаемостью) может служить основанием для разработки возможных путей коррекции существующих иммунодефицитов, что могло бы способствовать увеличению продолжительности жизни больных раком молочной железы при различных молекулярных подтипах заболевания. Достоверная ассоциация низких уровней В1 клеток с неблагоприятным молекулярным вариантом (тройной-негативный) открывает возможности поиска методов стимуляции этой популяции В-клеток.

Личный вклад

Автор самостоятельно провел тщательный анализ отечественной и зарубежной литературы по избранной научной теме, изучил степень разработанности проблемы, на основании чего были сформулированы цель и задачи исследования. Самостоятельно составлена структура и дизайн диссертационной работы, обработаны результаты лечения больных, проведен статистический анализ информации, интерпретация полученных данных, сформулированы выводы и практические рекомендации. Результаты исследования оформлены автором в виде диссертации, опубликованы в печатных работах.

Соответствие паспорту специальности

Задачи и положения, выносимые на защиту диссертации, полученные результаты соответствуют паспорту специальности 3.1.6 Онкология, лучевая терапия («медицинские науки») и направлению исследований п.10. «Оценка эффективности противоопухолевого лечения на основе анализа отдаленных результатов».

Положения, выносимые на защиту

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

Внедрение результатов исследования

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 гемопоза отдела клинико-лабораторной диагностики НИИ

клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

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 клинико-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.

Публикации

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».

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений, библиографического указателя. Список литературы включает 138 источников, в том числе 25 отечественных и 113 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 28 рисунками и 20 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы 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 2013-2016 гг. (2013 – 32 больных, 2014 – 19, 2015 – 28, 2016 – 18), единичные больные обследованы в более ранние и более поздние сроки. 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). Основным критерием включения в исследование являлось изучение

образцов костномозгового пунктата у первично-операбельных больных раком молочной железы (T1-3N0-1M0). Пациентки, получавшие неоадьювантное лечение, из исследования были исключены.

В исследовании преобладали пациентки со II (62.7%) стадией заболевания. Диагноз был верифицирован гистологически и иммуногистохимически. Преобладали пациенты с гистологическими заключениями: инфильтративный протоковый рак; и по степени дифференцировки злокачественных клеток: умеренная степень дифференцировки – G II. У 32 пациенток выявлено метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов. В таблице 1 представлено распределение больных по стадиям и гистологическим характеристикам.

Таблица 1 - Распределение больных раком молочной железы по стадиям и гистологическим характеристикам

Клинико-гистологические характеристики	Количество больных (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

При анализе молекулярного подтипа установлено, что у 35 (33%) больных был определен люминальный А тип; у 40 (37%) пациенток - люминальный В Her2- негативный тип;

у 15 (14%) пациенток - люминальный В Her2- позитивный; Her2- позитивный тип определен лишь у 4 (4%) пациенток; трижды-негативный тип - у 13 (12%) пациенток (Таблица 2).

Таблица 2 - Распределение больных по молекулярно-биологическим подтипам

Подтипы рака молочной железы	Количество больных	Процент (%)
Люминальный А	35	33%
Люминальный В Her2/neu-негативный	40	37%
Люминальный В Her2/neu-позитивный	15	14%
Нелюминальный Her2/neu-позитивный	4	4%
Трижды-негативный	13	12%
Итого	107	100%

Всем пациенткам, которые вошли в исследование, на первом этапе было проведено хирургическое лечение в объеме: радикальной резекции молочной железы – 41(38,3%) пациентке, мастэктомии с сохранением грудных мышц – 66 (61,7%) пациенткам. После операции химиотерапию получили 70 пациентов, лучевая терапия проведена 58 пациентам, гормонотерапия – 90 пациентам.

Морфологическое исследование костного мозга

Для морфологического исследования, в первую очередь, выполняли просмотр препаратов на предмет исключения опухолевых клеток в костном мозге. Затем проводили подсчет общего количества миелокарицитов. 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).

Иммунофенотипирование костного мозга

Исследование лимфоцитов костного мозга выполнялось путем иммуофлуоресцентного окрашивания с применением моноклональных антител, которые представлены в таблице 3.

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.

Таблица 3 – Панель моноклональных антител

№	Антитела/флуорохромы							
	PerCPCy 7	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
5	CD56	CD94	CD45	CD16	HLA-DR	CD3	CD2	CD8
6	CD56	CD94	CD45	CD16	CD7	CD3	CD2	CD8
7	CD56	CD94	CD45	Perforin	Granzyme	CD3		
8	CD56	CD94	CD45	CD57	CD26	CD3		

Результаты исследования

В ходе нашего исследования были определены показатели общей, безрецидивной выживаемости, а также показатели локорегионарного контроля и отдаленного метастазирования.

Морфологическое исследование костного мозга (миелограмма) проведено всем больным. Исследование субпопуляций костного мозга в различные годы претерпевало изменения. Наиболее многочисленные группы: CD3 (95 больных), CD4 – 90, CD8 – 90, CD4/CD8 – 89, CD8+HLA-DR+/- -83, CD4+CD25+/- -80, CD19 – 80, CD19+CD10+/- - 81, CD19+CD38+/- -88, CD19+CD5+/- -87. Остальные субпопуляции (указаны в тексте) изучены у меньшего количества больных.

Факторы прогноза при раке молочной железы

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

Наиболее важным клиническими факторами прогноза при раке молочной железы являются поражение регионарных лимфатических узлов и рецепторный статус больных.

В анализируемой группе у 75 пациенток поражение лимфатических узлов отсутствовало (N0), а у 32 – соответствовало индексу N+. Разницы между группами не было в общей выживаемости (ОВ) ($p=0,324$), безрецидивной выживаемости ($p=0,322$) и безметастатической выживаемости (БМВ) ($p=0,247$). Вместе с тем, выживаемость без прогрессирования (ВБП) у больных с индексом N+ 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 1).

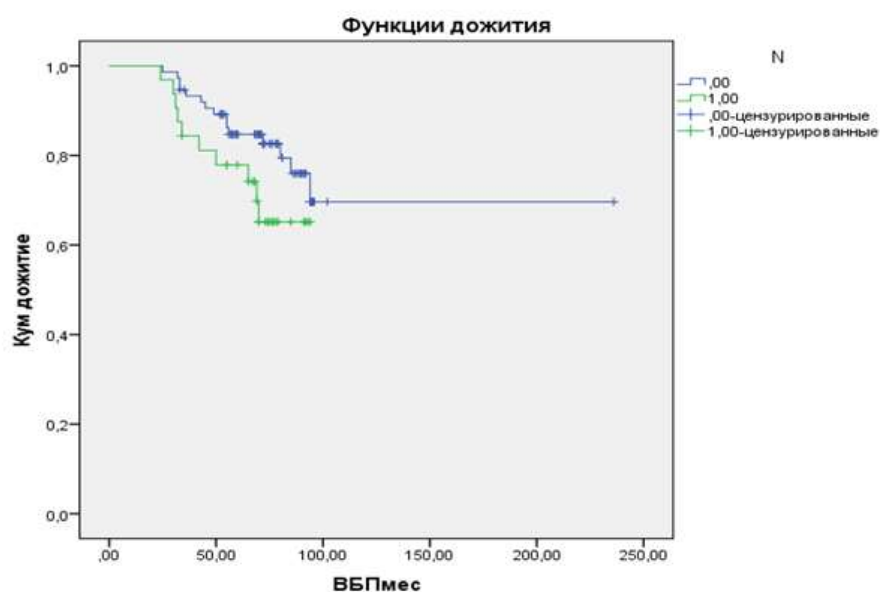


Рисунок 1 – Кривые выживаемости без прогрессирования больных раком молочной железы в зависимости от наличия метастазов в регионарных лимфатических узлах

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 2.

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-Уор – $0,017$.

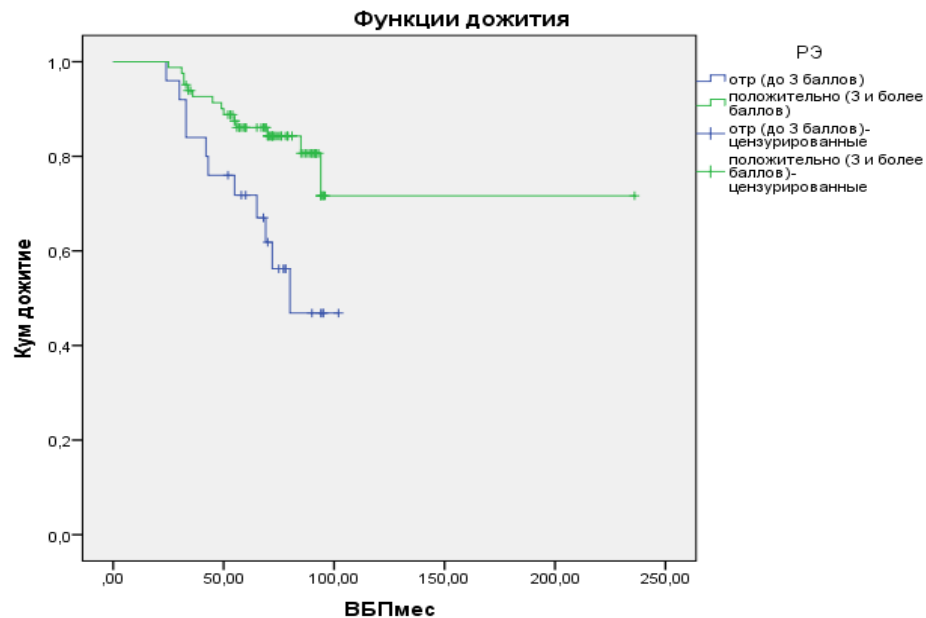


Рисунок 2 – Кривые выживаемости без прогрессирования больных раком молочной железы в зависимости от наличия рецепторов эстрогенов в опухоли

Интегральным фактором прогноза, влияющим на выбор тактики лечения, является принадлежность опухоли к тому или иному молекулярному подтипу.

Молекулярные подтипы рака молочной железы существенно различаются по прогнозу. Показатели общей выживаемости не различаются между этими подтипами. Оценка безметастатической выживаемости по группе выявила достоверные различия ($p=0,038$) между молекулярными вариантами рака молочной железы (Рисунок 3).

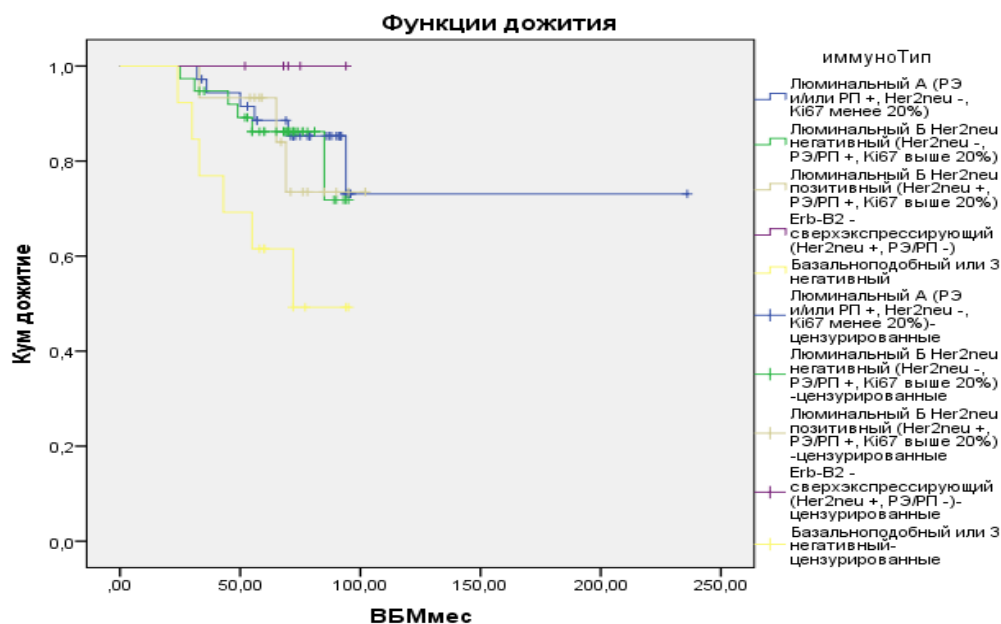


Рисунок 3 – Показатели безметастатической выживаемости при всех молекулярных подтипах рака молочной железы

При сравнении показателей выживаемости без прогрессирования всех 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 4).

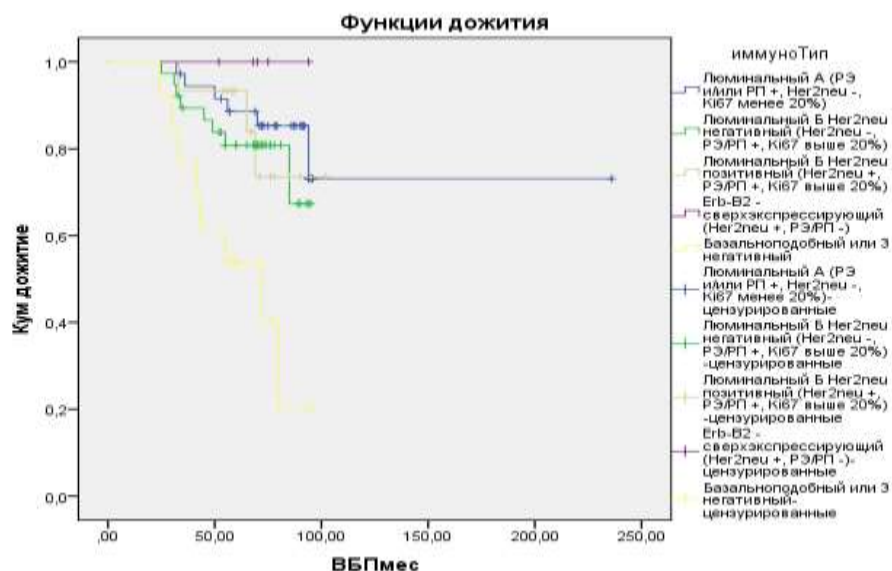
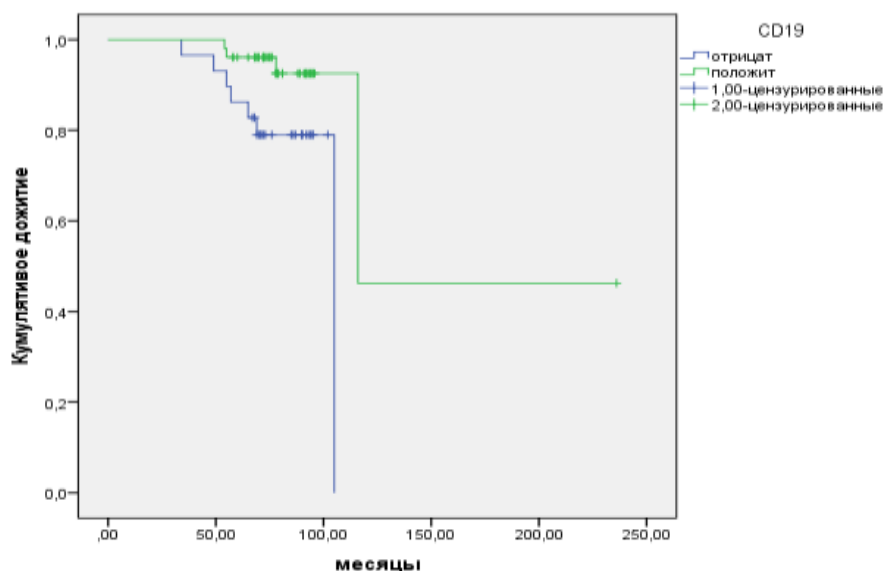


Рисунок 4 – Показатели выживаемости без прогрессирования при всех молекулярных подтипах рака молочной железы

Таким образом, наиболее благоприятным в нашем исследовании 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.

Роль субпопуляций лимфоцитов костного мозга в прогнозе рака молочной железы. Субпопуляции В-лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы в прогнозе заболевания

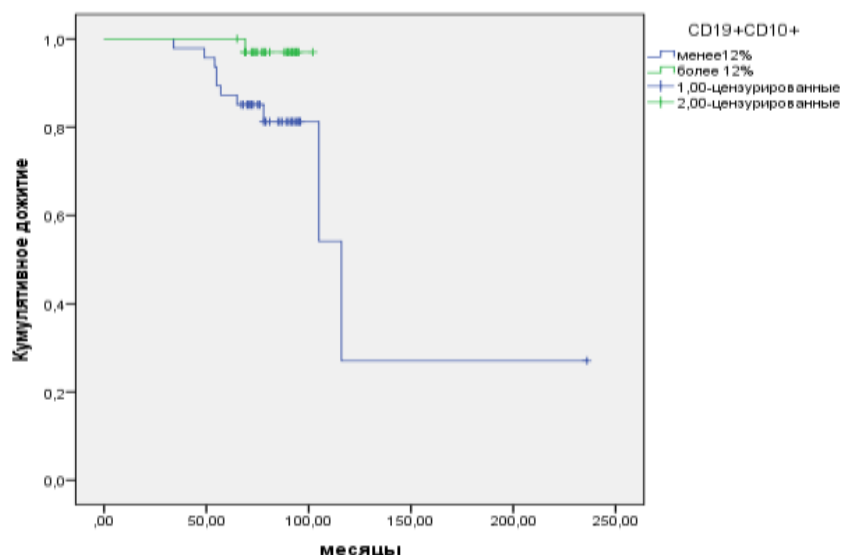
Процентное содержание В-лимфоцитов костного мозга было достоверно связано с прогнозом рака молочной железы. В случаях наличия В-лимфоцитов более 10% показатели выживаемости были более благоприятными, $p=0,019$ (Рисунок 5).



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

Рисунок 5 – Кривые общей выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от уровней В-лимфоцитов в костном мозге

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 6). Прогностическая роль субпопуляции C19+CD10+ реализовывалась при сроках наблюдения за больными более 5 лет.



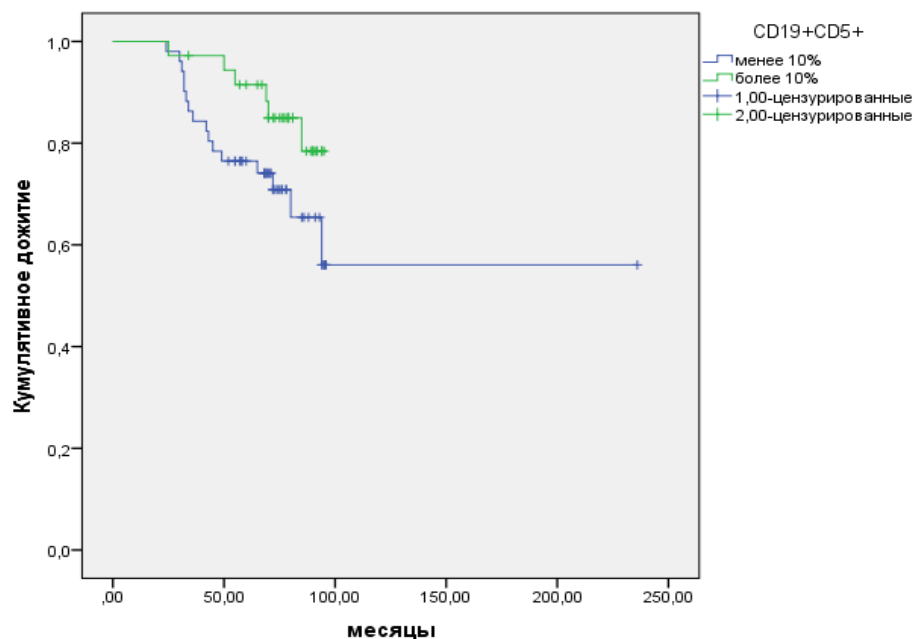
Зеленый цвет – более 12% (34 больных), синий цвет – менее 12% (47 больных)

Рисунок 6 – Показатели общей выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от уровней предшественников В-лимфоцитов (CD19+CD10+) в костном мозге

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 некоторые 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 костного мозга, 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 7). Причем, разница в этих показателях наблюдалась уже начиная с 3-летнего периода наблюдения после операции.



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

Рисунок 7 – Кривые выживаемости без прогрессирования больных раком молочной железы в зависимости от уровней В1-лимфоцитов (CD19+CD5+) в костном мозге

Т- и NK-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-. При влиянии на выживаемость больных раком молочной железы состояния Т- и NK-клеточных субпопуляций костного мозга выявлен ряд интересных фактов.

Основная связь с прогнозом продемонстрирована для CD4-лимфоцитов – наличие более 30% этих клеток в костном мозге ассоциировалось с благоприятным прогнозом: более продолжительной общей выживаемостью (лог ранк – $p=0,128$; Бреслоу - $p=0,028$; Тарон-Уор – $p=0,032$), (Рисунок 8). Нормальные и повышенные значения отмечены в 61 случае, сниженные – в 29.

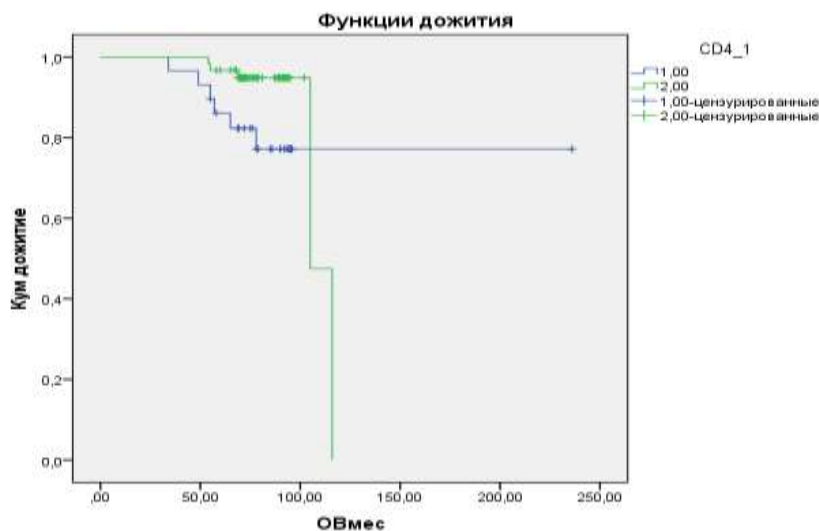


Рисунок 8 - Кривые общей выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от уровней CD4-позитивных лимфоцитов костного мозга

Общее содержание зрелых Т-лимфоцитов в костном мозге изучено у 95 больных раком молочной железы, к положительным случаям отнесены 53 пациентки, к отрицательным – 42. Сравнение показателей выживаемости в этих 2 группах не выявило достоверных различий: ОВ – $p=0,388$; БРВ – $p=0,453$, ВБМ – $p=0,311$. Выживаемость без прогрессирования не достоверно различалась между группами ($p=0,198$). Если проанализировать показатели выживаемости без прогрессирования при сроках наблюдения более 70 мес., то они близки к достоверным, $p=0,08$; в группах сравнения 22 (уровни CD3 ниже 60%) и 32 больных (уровни CD3 $\geq 60\%$). Интересно отметить, что более высокие уровни выживаемости отмечены при низких уровнях CD3, (Рисунок 9).

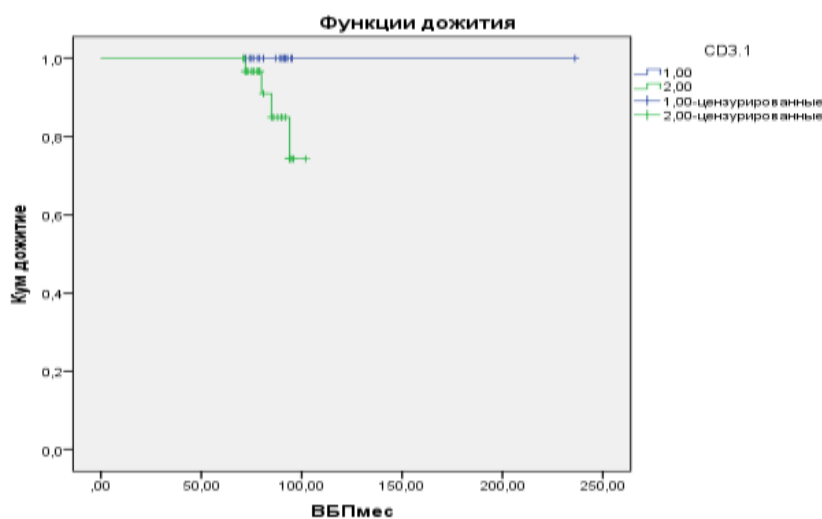


Рисунок 9 – Показатели выживаемости без прогрессирования в группе больных раком молочной железы с низкими уровнями костномозговых CD3-лимфоцитов

T-цитотоксические лимфоциты (CD8) и соотношение CD4/ CD8 не влияли на прогноз, так же, как и субпопуляции активированных T-клеток (HLA-DR+), CD45RO+. Не установлено влияния на прогноз CD16+CD56+ лимфоцитов, а также NK-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.

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

B, T-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.

Ранее нами было продемонстрировано, что B-линейные субпопуляции костного мозга также имеют связь с прогнозом (общей выживаемостью) рака молочной железы. Интересным представилось оценить взаимосвязь прогностически значимых иммунологических показателей костного мозга с молекулярными типами рака молочной железы.

В этой связи проанализировали соответствующие связи с CD19-лимфоцитами, а также субпопуляциями CD19+CD10+ и CD19+CD38+. Ни с одной из указанных субпопуляций молекулярные варианты не были связаны, по таблицам сопряженности признаков, $p=0,3-0,52$.

При проведении сопоставлений популяции B1-лимфоцитов (CD19+CD5+) с молекулярными типами рака молочной железы отмечены более низкая частота значимых уровней B1-лимфоцитов при базальноподобном раке 18,2% и максимальная - при Erb-B2-сверхэкспрессирующем варианте 75% ($p=0,114$), (Таблица 4).

Таблица 4 - Сопряженность уровней В1-лимфоцитов костного мозга с молекулярными подтипами рака молочной железы

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

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 тройного-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 4. И, хотя уровни В1-лимфоцитов были при этом типе максимальными (Таблица 5), различия не были достоверными, $p=0,43$.

Таблица 5 - Сравнение среднего значения В1-лимфоцитов костного мозга при гиперэкспрессии Erb-B2 и остальных молекулярных подтипах рака молочной железы

CD19+CD5+ клетки			
Молекулярные подтипы	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 6).

Таблица 6 – Сравнение по уровням В1-лимфоцитов костного мозга тройного-негативного подтипа рака молочной железы с подтипом гиперэкспрессией Erb-B2

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

Разница в уровнях В1-клеток была более, чем втрое, 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 7).

Таблица 7 – 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%)

Молекулярные подтипы		CD19CD5		Итого
		отрицательно	положительно	
Нелюминальный Her2/neu- позитивный	Частота	1	3	4
	Процент	25,0%	75,%	100,0%

Продолжение таблицы 7

Тройной негативный	Частота	9	2	11
	Процент	81,0%	18,2%	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, $p=0,039$.

Так же, оценили роль субпопуляций костномозговых лимфоцитов в прогнозе люминального рака молочной железы.

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

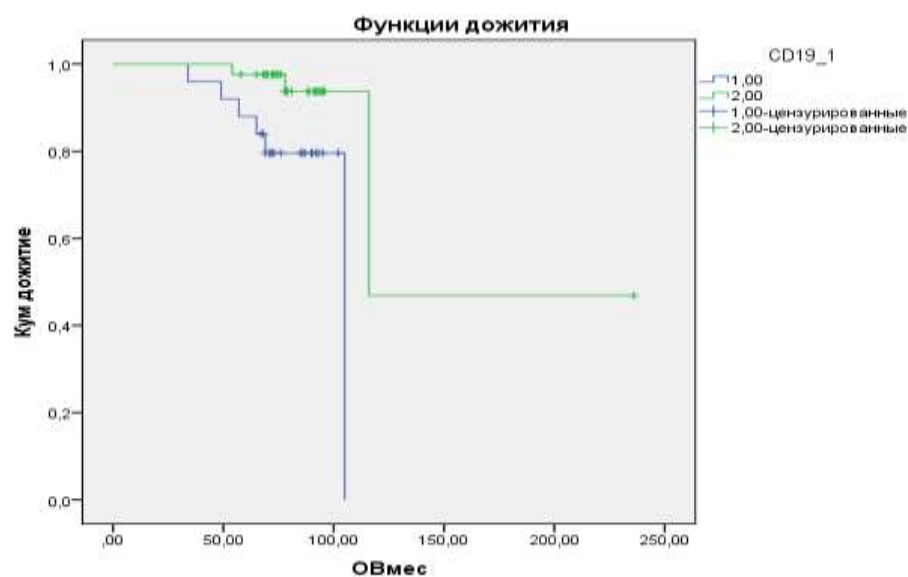


Рисунок 10 – Показатели общей выживаемости больных люминальным раком молочной железы в зависимости от уровней В-лимфоцитов

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, $p=0,08$.

Оценили также взаимосвязь между молекулярными подтипами рака молочной железы и T/NK-клеточными популяциями лимфоцитов костного мозга, имевшими взаимосвязь с показателями выживаемости (CD3, CD4, CD8+HLA-DR+). Ни с одной из указанных субпопуляций молекулярные варианты не были связаны.

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 ($p=0,08$).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Изучение субпопуляции лимфоцитов костного мозга у больных раком молочной железы требует дальнейшего изучения и проработки. Полученные результаты исследования позволят определить перспективы дальнейшей разработки темы:

- расширение исследований на более крупных и однородных выборках позволит получить более достоверные данные о роли субпопуляции лимфоцитов костного мозга в развитии, прогрессировании и лечении рака молочной железы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Бердова, Ф.К.** Субпопуляции В-лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы в прогнозе заболевания / Ф.К. Бердова, И.К. Воротников, Н.Н. Тупицын // Российский биотерапевтический журнал. — 2022. — Т. 21.— №1. — С. 50-56.
2. **Бердова, Ф.К.** Т- и NK-клеточные субпопуляции лимфоцитов костного мозга в прогнозе рака молочной железы / Ф.К. Бердова, И.К. Воротников, Н.Н. Тупицын// Онкогинекология. 2022. — №1. — С. 16-25.
3. **Бердова, Ф.К.** Молекулярные подтипы и иммунная система костного мозга в прогнозе рака молочной железы / Ф.К. Бердова, Т.А. Григорьева, И.К. Воротников, Н.Н. Тупицын // Российский биотерапевтический журнал. — 2022. — Т. 21. – №2, — С. 40-46.