

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

*На правах рукописи*

**ДЖУМАНАЗАРОВ ТЕМИРБЕК МАТЧАНОВИЧ**

**ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОСТНОГО  
МОЗГА У БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**

14.01.12 – Онкология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук

**Аллахвердиев Ариф Керимович**

доктор медицинских наук, профессор

**Тупицын Николай Николаевич**

**Москва – 2020 г.**

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

|   |     |
|---|-----|
| ВВЕДЕНИЕ.....   | 3   |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....  | 13  |
| 1.1. Эпидемиология НМРЛ.....  | 13  |
| 1.2. Современные аспекты лечения НМРЛ.....  | 15  |
| 1.3. Диссеминированные опухолевые клетки.....   | 24  |
| 1.4. Основные субпопуляции лимфоцитов костного мозга .....  | 38  |
| 1.5. Состояние гемопоэза у онкологических больных .....   | 50  |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....   | 53  |
| 2.1. Характеристика клинического материала больных НМРЛ.....  | 53  |
| 2.2. Методы исследования .....  | 62  |
| 2.3. Статистическая обработка результатов исследования.....   | 68  |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....   | 69  |
| 3.1. Диссеминированные опухолевые клетки в костном мозге у больных НМРЛ и их взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками опухоли..... | 69  |
| 3.2. Основные показатели миелограммы больных НМРЛ и их взаимосвязь с ДОК..  | 78  |
| 3.3. Лимфоцитарные популяции костного мозга и их взаимосвязь с морфологическими характеристиками опухоли, параметрами миелограммы .....           | 92  |
| ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 102 |
| ВЫВОДЫ .....  | 114 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....   | 116 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....   | 117 |

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак легкого является одним из наиболее частых онкологических заболеваний во всем мире, ежегодно регистрируется более 2 млн. новых случаев рака легкого. Высокая заболеваемость отмечается как в странах Европы, США, так и в России [32, 160]. Каждый год по всему миру от рака легкого умирает 1,59 миллиона человек. В США 2018 году зарегистрировано 121 680 новых случая у мужчин и 112 350 — у женщин, смертность при этом составила 26% и 25% соответственно [32]. В России рак легкого занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости у мужчин (16,9%) и девятое место у женщин (4,0%) [11]. По данным А.Д. Каприна за десятилетие заболеваемость раком легкого в России выросла с 46 520 до 48 307 человек в год, а в 2018 году от рака легкого умерло 50774 человек [11].

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет подавляющее количество случаев рака легкого, достигая 80%, и является довольно гетерогенной опухолью. В случае выявления НМРЛ на ранних стадиях (I-II) возможно хирургическое лечение, по результатам которого 5-летняя выживаемость больных составляет в среднем 30%. Но, несмотря на радикальность операции, НМРЛ отличается высокой частотой рецидивов: большинство больных (22-38%) столкнутся с возвратом болезни уже на первом году после хирургического лечения [15]. При распространенных стадиях (III) возможна комбинация операции и лучевых методов, а также химиотерапии, что позволяет прожить 3 года 26% больным [28].

Однако НМРЛ в большинстве случаев диагностируют на поздних стадиях, когда возможности хирургического лечения ограничены [16]. Выживаемость таких больных довольно низкая: пять лет переживают около 18% пациентов [63, 32, 160]. Современные виды лекарственной терапии, включающие в себя иммунотерапию и таргетную терапию, позволяют продлить жизнь больным и в ряде случаев улучшить ее качество. Однако при этом они отличаются высокой

токсичностью, спектром нежелательных иммуно-опосредованных явлений, имеют ограниченные показания ввиду молекулярно-биологических особенностей опухоли, генетические мутации которой не всегда позволяют продолжать выбранный вид лечения, обуславливая устойчивость опухоли к проводимой терапии [68,120, 150, 151]. На сегодняшний день апробируются разнообразные режимы для преодоления опухолевой резистентности [136].

Неoadьювантные режимы лекарственной терапии при локализованном и местно-распространенном НМРЛ, исследуемые в последнее время, могут помочь девитализации опухолевых клеток перед хирургическим вмешательством; оказать воздействие на субклинические (микрометастические) очаги, располагающиеся как в лимфатических узлах, так и в отдаленных органах, включая костный мозг (КМ) [153, 48, 67]. По данным исследований SieneI W. установлено, что наличие микрометастазов (диссеминированных опухолевых клеток - ДОК) в КМ больных НМРЛ коррелирует с неблагоприятным прогнозом [113]. Ухудшение отдаленных результатов лечения НМРЛ при наличии ДОК в КМ также показано и в исследованиях других ученых, которые отмечали снижение безрецидивной выживаемости и общей выживаемости больных [126, 54, 130, 122, 135, 166, 90, 184, 113]. Вместе с тем установлена взаимосвязь ДОК с клинико-морфологическими характеристиками НМРЛ: размером первичной опухоли, степенью дифференцировки, статусом лимфатических узлов [126, 184].

Известно, что популяции ДОК отводят ведущую роль в процессах самоподдержания и метастазирования злокачественных процессов. Особый фенотип ДОК сопряжен с их состоянием покоя, которое обуславливает их устойчивость к системной терапии и длительную персистенцию в КМ онкологического больного [29, 36]. Это дает основания для более детального изучения микрометастатических очагов НМРЛ в КМ и их микроокружения. От решения этого вопроса зависит выбор адекватного лечения больного и положительный исход заболевания.

Наравне с этим в последние годы важное значение отводится изучению субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных: опухоль

инфильтрирующих лимфоцитов, лимфоцитов в периферической крови и в КМ [5, 50, 107, 155, 162]. Сообщается о прогностическом значении популяции CD8+CD28+Т-клеток и CD8 +CD28- Т-клеток у больных НМРЛ [105,106], увеличении содержания популяции CD4+CD25+ у больных раком легкого [89].

По данным научных исследований иммунокомпетентные клетки в КМ могут играть важную роль в предотвращении роста и развития опухоли [47]. Сообщается, что в КМ больных при наличии в нем ДОК изменяется пропорция субпопуляций CD4+, CD8+, CD56+ клеток [64]. Так, уровни CD8+лимфоцитов в КМ больных раком молочной железы снижаются в случае наличия поражения КМ [19]. Интересные данные получены при анализе взаимосвязи между популяцией лимфоцитов КМ и гистологическими видами рака. При инфильтративно-протоковом раке молочной железы в сравнении с инфильтративно-дольковым увеличено содержание CD10+В-лимфоцитов [7]. Повышенное содержание В-клеток в опухоли, отмечено при плоскоклеточном НМРЛ [165]. Отмечается повышение уровня CD16+CD3–NK-клеток в КМ [17]. По результатам исследований субпопуляций лимфоцитов у онкологических больных становится очевидно, что их изучение необходимо для понимания взаимодействия опухоли и иммунной системы, а также детального анализа персистенции ДОК в КМ.

Важным разделом, приобретающим особое значение, становится изучение гемопоэза при злокачественных опухолях. Литературы по этой теме встречается немного. Ей посвящены единичные исследования, обнаруживающие существование взаимосвязей между гемопоэзом и развитием опухоли, в которых отмечены ряд особенностей эритропоэза, гранулоцитопоэза и проведены параллели с наличием ДОК в КМ [13,17,21,22].

Таким образом, на сегодняшний день актуально проведение более глубокого и детального изучения биологии НМРЛ: изучения микрометастатических очагов (диссеминированных опухолевых клеток), микроокружения опухоли, иммунологических факторов организма больного, включая популяционный состав лимфоцитов КМ и особенностей гемопоэза при НМРЛ, что может дать ответы на назревшие вопросы.

### **Цель исследования**

Изучить диссеминированные опухолевые клетки и субпопуляционный состав лимфоцитов в костном мозге больных немелкоклеточным раком легкого, оценить их взаимосвязь с показателями гемопоэза и степенью распространенности опухолевого процесса.

### **Задачи исследования**

1. Определить частоту обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от степени распространенности опухолевого процесса.

2. Изучить состав иммунокомпетентных клеток костного мозга больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от морфологического типа опухоли.

3. Охарактеризовать показатели кроветворения больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от наличия диссеминированных опухолевых клеток.

4. Провести анализ клинико-морфологических параметров в зависимости от поражения костного мозга больных при различных стадиях немелкоклеточного рака легкого.

5. Изучить взаимосвязь субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга с показателями гемопоэза у больных немелкоклеточным раком легкого.

6. Охарактеризовать особенности состава эффекторных звеньев иммунокомпетентных клеток костного мозга при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого.

### **Научная новизна**

Впервые в России проведено изучение ДОК в КМ, субпопуляций костномозговых лимфоцитов, изучение гемопоэза у больных НМРЛ.

Установлено, что наличие ДОК в КМ достоверно коррелирует с высокой степенью дифференцировки НМРЛ. Частота выявления ДОК при аденокарциноме была несколько выше, чем при плоскоклеточном раке.

Впервые показано, что субпопуляционный состав клеток костного мозга имеет взаимосвязь с гистологическим вариантом НМРЛ:

- плоскоклеточный рак легкого характеризовался более высоким содержанием костномозговых зрелых Т-клеток (CD3) и CD8-лимфоцитов (Т- и НК-клетки).

- для аденокарциномы была типичной В-клеточная реакция (CD20+CD45++).

Впервые установлено, что эффекторные (перфорин-содержащие) популяции лимфоцитов костного мозга имели связь с гистологическим вариантом НМРЛ:

- для аденокарциномы было характерно наличие CD4-позитивных цитотоксических лимфоцитов и экспрессия на эффекторах CD27.

Впервые установлено, что эффекторные перфорин-содержащие (CD8+Перфорин+, CD4+Перфорин+, CD27+Перфорин+) популяции лимфоцитов костного мозга при НМРЛ находятся в отрицательной корреляционной связи с миелоидными и эритроидными предшественниками.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Определение ДОК в КМ позволяет более точно оценивать степень распространенности опухолевого процесса у больных НМРЛ, выявляя ранний процесс гематогенной диссеминации опухоли. Это может служить основанием для рассмотрения вопроса о дополнительном лекарственном лечении у этой категории больных. Выявленная связь эффекторных субпопуляций лимфоцитов КМ (CD27+перфорин+) с гистологическим вариантом рака легкого позволяет выделить группу потенциальных кандидатов для иммунотерапии агонистами CD27.

Учитывая полученные результаты в отношении лимфоцитарных популяций КМ, целесообразно принять во внимание, что для разных гистологических форм характерны разные варианты иммунного ответа (Т-, НК-клеточного или

гуморального). Это поможет более направленно планировать таргетную и иммунотерапию у больных НМРЛ, выбирая препараты, влияющие на гуморальное или клеточное звено противоопухолевого ответа.

### **Методы и методология исследования**

Диссертационная работа выполнена на основании анализа данных больных НМРЛ, которые прошли обследование и получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2018 по 2019 гг. В соответствии с поставленными задачами были сформированы критерии, по которым производилось включение больного в исследование: верифицированный диагноз НМРЛ, отсутствие предшествующего лечения, отсутствие противопоказаний к стеральной пункции для забора КМ. Проведенное ранее хирургическое, лекарственное или лучевое лечение служили критериями исключения. Также в критериях исключения были доброкачественные опухолевые процессы, которые были выявлены после хирургического вмешательства по результатам гистологического исследования удаленного препарата. На проведение стеральной пункции каждым больным подписано информированное добровольное согласие.

Работа выполнена совместно с онкологическим отделением хирургических методов лечения №11 (торакальная онкология) и лабораторией иммунологии гемопоза НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

При обработке клинического материала учитывались возраст, пол, первичная локализация опухоли, наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах, наличие отдаленных метастазов, характер и объем хирургического вмешательства, гистологический тип НМРЛ, степень дифференцировки опухоли. Все показатели учитывались с целью последующего анализа взаимосвязи с иммунологическими данными исследования.

Морфологическое исследование КМ выполнялось согласно стандартному протоколу, включающему окрашивание препарата с последующим подсчетом миелограммы и расчетом индексов миелограммы, а также обязательной оценкой

наличия ДОК в исследуемом образце КМ, представленном в количестве не менее 6 стекол. Экспертное заключение основывалось на двух независимых мнениях врачей – морфологов. По результатам данного заключения из исследования исключались образцы, в которых наблюдалась разбавление КМ периферической кровью.

Иммунологическое исследование КМ проводилось методом многопараметровой проточной цитометрии, позволяющей проводить анализ большого числа событий с высокой скоростью. Этот метод основан на регистрации сигналов светорассеяния и флуоресценции от клеток, проходящих в ламинарном потоке жидкости под прицелом лазерного луча. Суспензия клеток КМ предварительно окрашивается флуоресцирующими красителями: моноклональными антителами, конъюгированными с различными флуорохромами (флуоресцеина изотиоцианат, фикоэритрин, перидинин-хлорофилл протеин, алллофикоцианин, тандемные красители). В момент прохождения клеткой лазерного луча флуорохромом испускается свет различной длины волны, который регистрируется специальным детектором. Выбор количества и типа флуоресцентных меток зависит от задачи исследования. Использование одновременно нескольких флуоресцентных меток позволяет проводить анализ до 8 маркеров включительно, что и было применено в данном исследовании. Оцениваются как поверхностные, так и внутриклеточные антигены. Обработка полученных в ходе сбора клеток цитометрических данных проводится в программе FCS express v.3, Kaluza Analysis v2.1. Современная программа–Kaluza обеспечивает объединение нескольких цитометрических файлов в один, что предоставляет возможность одномоментного анализа большого числа событий (10 – 100 млн), которое требуется при изучении нефракционированного КМ.

Для проведения статистического анализа использовалось программное обеспечение SPSS, v. 21. В процессе обработки данных, во-первых, производилось выявление отличий анализируемых показателей и их взаимосвязей в проверяемых выборках. Во-вторых, определяли наличие и величину связи (или зависимости) одного или нескольких анализируемых параметров с другими

показателями. Для этого использовали различные статистические методы, учитывая границы применимости каждого из выбираемых способов обработки имеющихся данных исследования. В случае невозможности применения параметрических методов анализа для переменных непрерывного типа, а также при малых объемах выборок, использовались непараметрические методы (например, критерий Манна-Уитни). При нормальном распределении оценка различий между количественными показателями проводилась с использованием Т-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Для сравнения качественных показателей применяли точный критерий Фишера и  $\chi^2$ . Методом вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена и проверки его значимости определяли величину ранговой взаимосвязи порядковых/количественных показателей. Определение силы линейной связи двух количественных показателей осуществляли методом вычисления коэффициента корреляции Пирсона с проверкой его значимости.

### **Положения, выносимые на защиту**

Обнаружение ДОК в КМ больных НМРЛ возможно методом многопараметровой проточной цитометрии. Комбинация маркеров CD45, EpCAM / KL позволяет выявить в КМ больных НМРЛ ДОК с частотой 43,5% (при пороговом значении 1 клетка на 10 млн. миелокариоцитов ( $1 \times 10^{-7}$ )). При этом у большинства больных отсутствовали макрометастазы, определяемые стандартными методами обследования.

Выявление ДОК на ранних стадиях НМРЛ свидетельствует о ранней гематогенной диссеминации опухоли.

Наличие ДОК в КМ больных НМРЛ не коррелирует с полом, возрастом, размером первичной опухоли, статусом лимфоузлов, стадией, морфологическим видом НМРЛ. Обнаружение ДОК в КМ больных НМРЛ имеет связь со степенью дифференцировки опухоли. При высокодифференцированном НМРЛ отмечается более частое поражение КМ. Выявление ДОК в КМ больных НМРЛ чаще наблюдается при нормальных показателях гранулоцитопоза.

Субпопуляционный состав клеток КМ имеет взаимосвязь с гистологическим вариантом НМРЛ, что отражает разный характер противоопухолевого иммунного ответа. Высокое содержание зрелых Т-лимфоцитов (CD3, CD8) отмечается при плоскоклеточном типе НМРЛ. Повышенное содержание зрелых В-клеток более характерно для аденокарциномы.

Гистологические типы НМРЛ отличаются по уровню костномозговых перфорин-содержащих популяций лимфоцитов. Повышенное содержание CD4 цитотоксических лимфоцитов, CD27- экспрессирующих лимфоцитов наблюдаются при аденокарциноме. Отдельные эффекторные перфорин-содержащие (CD8+Перфорин+, CD4+Перфорин+, CD27+Перфорин+) популяции лимфоцитов КМ при НМРЛ взаимосвязаны с показателями гемопоэза. Их отрицательная корреляция наблюдается с миелоидными и эритроидными предшественниками. Нарастание цитотоксического потенциала костномозговых перфорин-содержащих лимфоцитов сопровождается снижением содержания клеток эритроидного ростка КМ.

Необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение эффекторных перфорин-содержащих субпопуляций лимфоцитов при НМРЛ, воздействие на которые может использоваться для повышения эффективности противоопухолевого иммунитета.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Методы исследования, использованные в работе, соответствуют поставленным задачам, что обеспечивает достижение конечного результата. Достаточный объем клинического материала, использование высокотехнологичных методов диагностики и анализа получаемых данных, с применением компьютерных технологий, а также современных методов статистической обработки данных позволяют считать полученные результаты достоверными.

Материалы диссертационной работы представлены в виде 3 оригинальных статей в научных изданиях, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России. Основные положения научной работы доложены и обсуждены на

совместной научной конференции с участием онкологического отделения хирургических методов лечения №11 (торакальной онкологии), онкологического отделения лекарственных методов лечения №17 (химиотерапевтического), лаборатории иммунологии гемопоэза, лаборатории клинической иммунологии, лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Эпидемиология НМРЛ

Рак легкого является самым распространенным злокачественным новообразованием во всем мире, занимая лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости как мужского, так и женского населения. Ежегодно диагностируется более 2 миллионов новых случаев рака легкого по всему миру, из них почти половина приходится на индустриально развитые страны [32, 160]. Наиболее высокая заболеваемость раком легкого наблюдается в США и странах Европы, в то время как в Восточной Азии, Южной Америке, Австралии она несколько ниже. В США 2018 году зарегистрировано 121 680 новых случаев у мужчин и 112 350 — у женщин, смертность при этом составила 26% и 25% соответственно [32].

В России за последние десять лет отмечается неуклонный рост заболеваемости раком легкого, которая ежегодно повышается на 5-8% и составляет 25% у мужчин и 4,3% у женщин. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями населения России рак легкого, трахеи и бронхов занимает третье место, уступая лишь злокачественным новообразованиям кожи и раку молочной железы [11]. Чаще всего рак легкого возникает у пожилых людей. Средний возраст заболевших, как правило, составляет 65,8 лет. В более молодом возрасте рак легкого встречается реже и не превышает 2%. Смертность от рака легкого по данным мировой статистики составляет более полутора миллионов человек ежегодно [32]. В России в 2018 году от рака легкого умерло 50774 человек [11].

Ввиду бессимптомного течения рак легкого у большинства больных выявляется на III-IV стадиях опухолевого процесса, когда возможности хирургического лечения упущены и пациенты в большинстве случаев могут рассчитывать только на проведение лекарственной терапии [16]. Различные химиотерапевтические режимы, используемые в лечении НМРЛ, не столь эффективны, как хотелось бы и отличаются выраженной токсичностью.

Возможности проведения иных видов лекарственной терапии ограничены не только молекулярно-генетическими особенностями опухоли, но и целым рядом нежелательных иммуноопосредованных явлений, а также нехваткой финансовых ресурсов. Поэтому результаты лечения такой категории больных весьма неутешительны: по данным статистики, летальность на первом году достигает 50%, а 5-летняя выживаемость таких больных, как правило, не превышает 18% [63, 32, 160]. Довольно редко удается диагностировать рак легкого на раннем этапе его развития, но это немногочисленные случаи и, как правило, они являются находкой при диспансеризации или случайном обращении пациента к врачу по совершенно другому поводу. В случаях диагностики рака легкого на ранних стадиях, благодаря возможности выполнения хирургического вмешательства, 5-летняя выживаемость может достигать 50%. К сожалению, даже при малом размере опухоли (опухоль менее 1 см) и радикальной операции (R0 – отсутствие опухолевых клеток по краю резекции, отсутствии метастатического поражения лимфоузлов), 25% больных в течение 5 лет столкнутся с рецидивированием опухолевого процесса [15]. Поэтому лечение даже локализованных форм НМРЛ представляет серьезные трудности и требует решения еще многих вопросов для достижения удовлетворительных результатов.

Согласно морфологической классификации, выделяют две большие группы рака легкого: НМРЛ и мелкоклеточный рак. НМРЛ, объединяя в себе несколько гистологических подвидов (плоскоклеточный, аденокарцинома, саркоматозный, железисто-плоскоклеточный), представляет собой довольно гетерогенную злокачественную опухоль. Наиболее часто встречается плоскоклеточный рак — 70-75% случаев, преобладание которого наблюдается у мужчин. Аденокарцинома, которая составляет около 20-25% и может быть разной степени дифференцировки, чаще всего развивается у женщин, в особенности у тех женщин, которые получают гормонозаместительную терапию [3]. Каждая морфологическая группа НМРЛ отличается разнообразным клиническим течением, молекулярно-генетическим профилем, особенностями ответа на проводимую лекарственную терапию и прогнозом.

## 1.2. Современные аспекты лечения НМРЛ

Долгие годы в лечении больных НМРЛ хирургическое вмешательство являлось единственно возможным и самостоятельным методом. На сегодняшний день подходы к терапии НМРЛ довольно разнообразны, что обусловлено рядом новейших разработок и их возможностью применения у данной категории больных. Выбор метода лечения НМРЛ зависит от многих факторов: распространенности опухолевого процесса, гистологического подвида опухоли, степени дифференцировки злокачественных клеток, наличия мутационной нагрузки, экспрессии молекулярных маркеров, коморбидного статуса больного, а также технической оснащенности и обеспеченности лечебного учреждения лекарственными противоопухолевыми препаратами. В совокупности все выбранные методы лечения определяют дальнейшее течение и прогноз заболевания.

Традиционным методом лечения больных локализованными формами НМРЛ является хирургическое вмешательство, которое благодаря современным технологиям, выполняется при помощи торакоскопического метода. Объем хирургического лечения может варьировать от выполнения лобэктомии до пневмонэктомии, при этом обязательным компонентом операции является медиастинальная лимфодиссекция [12]. Широко распространено мнение, что при малых размерах опухоли возможно провести радикальное лечение, однако при НМРЛ это не так. При I-II стадии опухолевого процесса радикальную операцию возможно выполнить у 20% больных [170, 143, 60]. После радикальных вмешательств может проводиться химиотерапия в адьювантном режиме, поскольку это позволяет улучшить 5-летнюю общую выживаемость и выживаемость без прогрессирования.

В случае поражения лимфатических узлов, в частности, соответствующем N3 (метастазы в лимфатических узлах средостения или корня легкого на противоположной стороне, прескаленных или надключичных лимфатических узлах на стороне поражения или на противоположной стороне) в большинстве случаев хирургическое вмешательство не показано. Наличие метастазов во

внутригрудные лимфатические узлы, особенно лимфатические узлы средостения - фактор прогноза с большой вероятностью свидетельствующий о наличии отдаленных микрометастазов [18]. Поэтому больным НМРЛ с III стадией планируется консервативное лечение в объеме химиотерапии, лучевой терапии или их комбинации с последующей оценкой возможности выполнения операции. Как правило, эту группу характеризует быстрая реализация отдаленного субклинического метастазирования, определяющая неудовлетворительные результаты лечения. По данным исследований, лишь 26% больных, получивших такое лечение имеют шансы прожить 3 года [28].

В ряде случаев как самостоятельный вид лечения у больных с III стадией может использоваться лучевая терапия, но при этом только 15% больных переживают 5 лет [99]. В основном лучевая терапия применяется как самостоятельный метод или с химиотерапией. Дистанционная лучевая терапия проводится как на первичную опухоль, так и на зоны регионарного метастазирования. На первичную опухоль разовая очаговая доза не превышает 2 Гр, планируемая суммарная очаговая доза должна быть не менее 60 Гр. При облучении зон регионарного лимфооттока разовая очаговая доза та же, но суммарная не должна превышать 40-45Гр.

Больным диссеминированным НМРЛ, как правило, не выполняется хирургическое пособие, а проводится лекарственное лечение, целью которого является увеличить продолжительность жизни больного, улучшить ее качество и по возможности контролировать симптомы болезни. Следует отметить, что лекарственная терапия НМРЛ претерпела значительные трансформации, которые ознаменовались рядом революционных открытий. С момента введения двухкомпонентных платиносодержащих схем прошло два десятилетия. За этот период апробированы различные комбинации и режимы первой и второй линии химиотерапии НМРЛ с включением доцетаксела и пеметрекседа.

Общепринятыми схемами химиотерапии первой линии являются режимы на основе платины, в том числе (этопозид + цисплатин (карбоплатин), паклитаксел + карбоплатин + бевацизумаб, винорелбин + цисплатин, паклитаксел + цисплатин,

гемцитабин + цисплатин (карбоплатин)), однако, эффективность этих режимов невысокая и последующие циклы химиотерапии сопряжены с выраженной токсичностью, что нередко служит увеличением интервала между ними. Поэтому предъявляются высокие требования к соматическому статусу больного, и оптимальным считается проведение четырех курсов платиносодержащей химиотерапии. В случае приемлемой токсичности и хорошей переносимости лечения пациентом возможна пролонгация до 6 курсов. Выживаемость на фоне химиотерапевтического лечения невысокая: год переживают не более 40% больных.

Изучение биологии НМРЛ позволило выявить целый ряд молекулярно-генетических особенностей опухоли, что послужило основой для создания и внедрения в клиническую практику новых видов лечения: адоптивной клеточной терапии (LAK), анти CTLA-4 и анти PD-1\ PDL-1 терапии, таргетной терапии [159]. Для определения возможности проведения таргетной терапии или иммунотерапии больным метастатическим НМРЛ проводится тестирование на наличие активирующих мутаций EGFR, транслокации гена ALK, транслокации ROS1 и мутации BRAF V600E, экспрессии PD-L1 (рисунок 1). Интересно отметить, что активирующие мутации выявляются преимущественно при аденокарциноме.

Частые мутации наблюдаются в гене EGFR (делеция в экзоне 19 и точечная мутация L858R в экзоне 21), следствием которых является активация сигнальных путей PI3K/ERK и RAS/MAPK. Больным, у которых установлено наличие мутаций в данном гене, планируется терапия ингибиторами тирозинкиназ EGFR. Частота мутаций EGFR, по данным Консорциума по изучению мутаций, составляет 23% [97].



**Рисунок 1** – Тактика лечения больных метастатическим НМРЛ в соответствии с клиническими рекомендациями RUSSCO

Молекулярно-направленная терапия проводится препаратами первого поколения (эрлотинибом, гефитинибом) или второго поколения (афатинибом). Преимущество ее в сравнении с химиотерапией подтверждено несколькими исследованиями, по результатам которых общая безрецидивная выживаемость была в два раза больше [174, 109, 117, 44]. Однако, только терапия афанитинибом позволила увеличить общую выживаемость больных, составившую, по данным разных исследований, от 31 до 33 месяцев [91, 137].

К сожалению, длительность таргетной терапии ограничена: на фоне терапии ингибиторами тирозинкиназ EGFR у больных вскоре развивается лекарственная резистентность, которая связана с мутацией T790 M. По данным научных исследований, альтернативой становится осимертиниб [120]. Следует отметить, данная мутация может быть определена в исходной опухоли, что обуславливает первичную резистентность к терапии. По данным ряда авторов, в 35-79% случаев опухолевая ткань содержит минорные клоны с мутацией T790 M, которые могут быть обнаружены параллельно с мутацией EGFR до начала лечения [150, 151, 68].

Другой пример альтераций, способствующих опухолевому росту это транслокации гена ALK: внутривхромосомная перестройка (парацентрическая инверсия) короткого плеча 2-й хромосомы, ведущая к образованию химерного онкогена EML4/ ALK [81]. Перестройки этого гена встречаются, по данным разных авторов, у 3-18% больных НМРЛ. Причем выявлена четкая ассоциация транслокации со следующими показателями: аденокарцинома, отсутствие конкурирующих мутаций (EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA), некурящие пациенты. До последнего времени, терапией выбора при наличии у больного НМРЛ транслокации ALK становится кризотиниб – первый мультикиназный ингибитор рецепторов ALK, ROS1, MET [158]. С течением времени опухоль становится устойчивой к данному виду терапии, благодаря появлению новых мутаций в киназном домене гена ALK. После прогрессирования на кризотинибе и химиотерапии у ALK/ROS1–позитивных больных, предлагается проводить терапию лорлатинибом, алектинибом, церитинибом [157, 125].

У небольшого числа больных (1-3%) НМРЛ, в основном – при аденокарциноме, выявляются мутации BRAF V600E, которые вызывают активацию сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK. При мутации BRAF V600E возможным режимом терапии является комбинация BRAF/MEK ингибиторов дабрафениба и траметиниба [144].

Открытие трансмембранного белка PD–1 и экспрессии PD–L1 опухолевыми клетками предоставило возможность оказывать воздействие на активность иммунного ответа больного. По данным исследований, посредством экспрессии молекул PD–L1 опухолевая клетка избегает иммунного ответа, поскольку связывание лиганда PD–L1 с рецептором PD–1 Т-лимфоцитов с приводит к их инактивации в результате блокирования сигнального пути PI3K/АКТ [123, 149, 167]: уменьшению пролиферации, цитотоксичности и высвобождения цитокинов из активированных Т-лимфоцитов. Иными словами взаимодействие PD–L1/ PD–1 играет ключевую роль в подавлении Т-клеточных иммунных реакций опухолью.

Молекула CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4) экспрессируется на Т-лимфоцитах и относится к корецепторам TCR. Она

конкурентно связывается с лигандом, не позволяя реализоваться второму активирующему сигналу от CD28, дополнительный сигнал с которого важен для активации Т-клеток при их взаимодействии с антигенным комплексом. Такая амплификация сигнала необходима, чтобы Т-клетки, распознав антиген, активировались и смогли осуществлять эффекторный этап противоопухолевого иммунного ответа. Кроме того, результатом экспрессии CTLA-4 Т-регуляторными лимфоцитами является уменьшение способности дендритных клеток к эффективной презентации антигена [100, 92]. Поэтому блокада активности CTLA-4 на иммунокомпетентных клетках снижает влияние отрицательной регуляции и позволяет в большей степени реализоваться уже существующему иммунному ответу на опухоль [147].

При обнаружении экспрессии PD-L1 опухолевыми клетками рассматривается назначение иммунотерапии так называемыми ингибиторами контрольных точек иммунитета, которые на сегодняшний день используются как в первой, так и во второй линиях терапии у больных метастатическим НМРЛ. Это анти PD-1 (ниволумаб, пембролизумаб), анти PD-L1 (дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб), анти CTLA4 (ипилимумаб, тремелимумаб) ингибиторы, продемонстрировавшие клиническую эффективность с хорошим профилем безопасности в нескольких фазах клинических исследований (таблица 1) [139].

**Таблица 1** - Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа у больных НМРЛ [139]

| <b>Вид</b>   | <b>Название</b> | <b>Показания</b>   |
|--------------|-----------------|--|
| Анти -PD1    | Ниволумаб       | II-линия терапии распространенного НМРЛ  |
|              | Пембролизумаб   | II линия терапии PD-L+ распространенного НМРЛ  |
| Анти -PD1-L1 | Дурвалумаб      | Рецидив НМРЛ после терапии EGFR ингибиторами<br>Ранее нелеченый НМРЛ<br>неоперабельный НМРЛ III стадии;<br>Полностью резецированный НМРЛ |

|             |              |  |
|-------------|--------------|--|
|             | Атезолизумаб | Нелеченный ХТ НМРЛ VI (PD-L+ или неселектированный)                                      |
|             | Авелумаб     | Рецидив НМРЛ   |
| Анти –CTLA4 | Ипилимумаб   | Рецидив/IV стадия плоскоклеточного НМРЛ  |
|             | Тремелилумаб | Ранее нелеченый распространенный НМРЛ<br>НМРЛ III/IV стадии после $\geq 2$ линий терапии |

Вместе с этим оказалось, что больные, у которых незначительная или отсутствует экспрессия PD-L1 опухолевыми клетками, также отвечают на терапию ингибиторами контрольных точек анти PD-1 [139, 73, 49]. Таким образом, в I линии иммунотерапии рекомендуется назначение ингибиторов контрольных точек у больных при экспрессии:

1. PD-L1  $\geq 50\%$  опухолевых клеток,
2. PD-L1  $\geq 1\%$  опухолевых клеток (в некоторых случаях),
3. С любым (или неизвестным) статусом PD-L1 в случае комбинированного лечения (химиотерапия+ иммунотерапия) [139, 73, 49].

Известно, что экспрессия PD-L1 может отличаться в первичной и метастатической опухоли, более того, различные метастатические очаги одной и той же опухоли могут иметь разную степень экспрессии этих молекул [45]. Следует отметить, что экспрессия PD-L1 изменяется в процессе опухолевой эволюции. Кроме того, в экспериментальной работе Ота К. и соавт. выявлено, что повышение экспрессии лиганда запрограммированной клеточной гибели наблюдается при активации сигнальных путей PI3K/AKT и MEK-ERK в результате мутации генов EGFR или ALK [124]. Последнее создает значительные трудности в разработке стратегий дальнейшего воздействия на иммунный ответ организма больного. В этой связи ведутся активные исследования и предлагаются различные варианты тактики ведения больных, включающие повторное определение PDL1 статуса опухолевых клеток. Кроме того существующие

ограничения в терапии анти PD1\PDЛ1 связаны с известной гетерогенностью опухолевой ткани. К сожалению, фрагмент опухоли, получаемый при биопсии не отображает полную картину всего новообразования [49].

Особые трудности в лечении представляют рефрактерные формы НМРЛ. К сожалению, варианты лечения больных распространенным НМРЛ после неудачи первой линии иммунотерапии весьма ограничены. На сегодняшний день в клинике апробируются разнообразные режимы иммунопрепаратов для преодоления опухолевой резистентности [136]. Например, исследование ниволумаба в качестве 2-й и последующих линий терапии у больных с распространенным НМРЛ. Результаты, полученные российскими учеными, подтвердили данные об его эффективности и безопасности [14]. Использование пембролизумаба (KEYNOT-001) во 2-й и последующих линиях терапии позволило достичь увеличения 5-летней общей выживаемости больных до уровня 25 % [71]. При применении другого иммунопрепарата атезолизумаба (исследования I фазы) 3-летняя выживаемость больных достигает 28% [82, 161].

Активное исследование ведется в плоскости неоадьювантного применения иммунотерапии при локализованных и местно-распространенных опухолевых процессах. Задачами неоадьювантной иммунотерапии НМРЛ в этом случае является: изменение механизмов иммунного контроля, что может вести к девитализации опухолевых клеток перед началом хирургического лечения; воздействие на субклинические (микрочастичные) очаги, располагающиеся как в лимфатических узлах, так и в отдаленных органах, включая костный мозг. В исследованиях, проведенных группой ученых под руководством Sienel W., установлено, что при НМРЛ наличие микрочастичек в костном мозге коррелирует с неблагоприятным прогнозом [113]. Это дает основание для более углубленного изучения микрочастичеческих очагов НМРЛ и их микроокружения, с перспективой анализа возможных путей их ликвидации.

Любопытные данные получены при изучении неоадьювантных режимов иммунотерапии (атезолизумаб, ниволумаб, ниволумаб + ипилимумаб) которые представлены несколькими исследованиями, проведенными у больных НМРЛ с

IA-IIIА стадиями (таблица 2). Больные после окончания иммунотерапии подвергались хирургическому вмешательству. Изучение удаленной опухолевой ткани позволяло оценить количество оставшихся жизнеспособных клеток опухоли. Критерием эффективности проводимого лечения являлся морфологический верифицированный противоопухолевый эффект (полный или значимый) [153]. Количество пациентов, получавших такое комбинированное лечение невелико: самое масштабное включало 84 пациента. Значимый морфологический ответ (MPR), что означает присутствие в удаленной опухоли менее 10% жизнеспособных опухолевых клеток, наблюдался по данным различных исследований в 18-45% случаев [153, 48, 67].

**Таблица 2 – Неoadьювантная иммунотерапия у больных НМРЛ**

| <b>Иммунопрепарат</b>                  | <b>Результат кол-во больных с MPR</b> | <b>Характеристика больных</b> | <b>Авторы</b>  |
|--|---------------------------------------|-------------------------------|--|
| Атезолизумаб                           | 18 %                                  | IB-IIIb n=84                  | Rusch V., Chافت J., Johnson B. et al. 2018 [153]         |
| Ниволумаб,<br>Ниволумаб+<br>Ипилимумаб | 17 %<br>33 %                          | IA-IIIА n=23<br>IA-IIIА n=21  | Cascone T., William W.N., Weissferdt A. et al. 2019 [48] |

Подводя итоги имеющихся на сегодня результатов лечения НМРЛ, следует отметить, что его эффективность довольно скромна и существуют большие трудности на пути достижения значимых улучшений в выживаемости больных данной категории. Хирургический метод лечения может использоваться ограниченно, поскольку к моменту установления диагноза у большинства больных НМРЛ уже имеются местно-распространенный процесс или недиагностируемые микрометастазы. Химиотерапевтическое лечение отличается выраженной токсичностью и невысокой эффективностью. Использование таргетной и иммунотерапии сначала продемонстрировало обнадеживающие результаты, но затем обнаружилось развитие резистентности опухоли к

проводимому лечению, что объясняется включением разнообразных механизмов, обеспечивающих выживание опухолевого клона. Вместе с тем проблемой стало развитие иммуноопосредованных нежелательных явлений, нередко сопряженных с жизнеугрожающими состояниями для больных, и это служит лимитирующим фактором для продолжения таргетной и иммунотерапии.

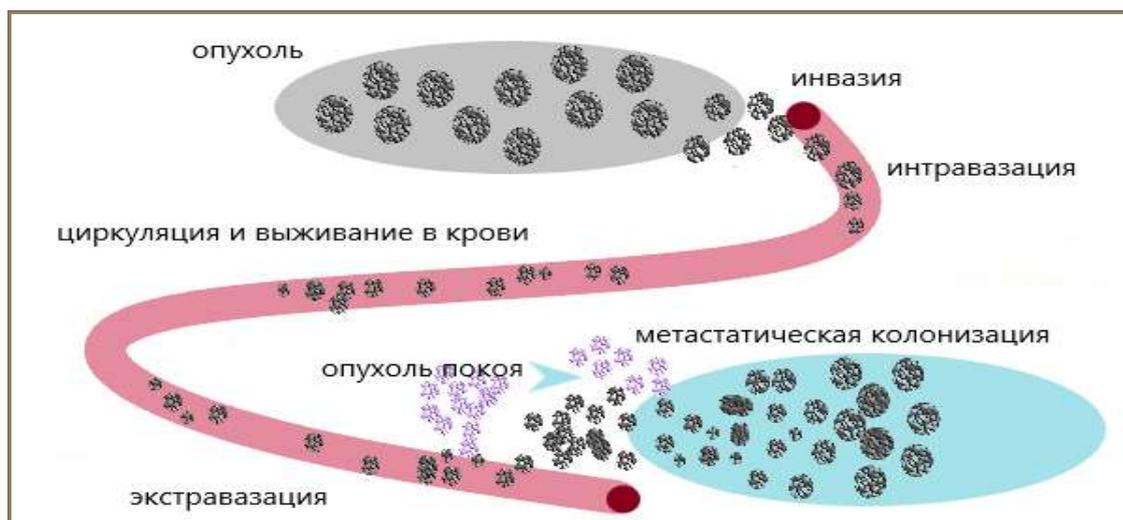
Кроме того, препятствием на пути эффективного использования препаратов указанного вида лекарственной терапии, является отсутствие строгих показаний к их назначению, ввиду постоянного изменения молекулярного профиля опухоли и индивидуальных особенностей иммунного ответа больных. Иными словами, отсутствуют четкие критерии отбора больных для такого рода терапии.

Становится очевидным, что поиск предикторов эффективности терапии и поиск точек воздействия в иммунорегуляторном звене является актуальным направлением онкологии. В этой связи возникает задача более глубокого и детального изучения биологии НМРЛ: изучения микрометастатических очагов (диссеминированных опухолевых клеток), микроокружения опухоли, иммунологических факторов организма больного, включая популяционный состав лимфоцитов костного мозга и особенностей гемопоэза при НМРЛ, что может дать ответы на назревшие вопросы.

### **1.3. Диссеминированные опухолевые клетки**

На протяжении уже многих десятилетий одной из главных проблем в онкологии, по-прежнему требующей решения, является гематогенное метастазирование опухолей, одним из проявлений которого является обнаружение диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в КМ. К сожалению, даже минимальные размеры опухоли не исключают метастатического распространения опухолевых клеток, которые оседая в отдаленных органах, таких как КМ, могут приводить к прогрессированию болезни даже спустя годы ремиссии. Этот процесс до сих пор является малоизученным аспектом биологии рака, но при этом остается самой частой причиной смертей больных злокачественными новообразованиями.

Гематогенное распространение опухолевых клеток представляет собой сложный и многостадийный процесс, изучение биологических основ которого, потребовало многочисленных фундаментальных исследований и сопровождалось выдвижением разных гипотез и теорий, порой противоречивых. (Рисунок 2). Благодаря новейшим разработкам в области диагностики опухолей (например, иммунофенотипирование, проведение генетического анализа), созданию и изучению новых экспериментальных моделей метастазирования опухолей стало возможным глубже понять молекулярные механизмы, лежащие в основе инвазивного поведения опухолевых клеток, их выживания за пределами первичной опухоли в периферическом кровотоке, поскольку очень малый процент циркулирующих опухолевых клеток достигает отдаленных органов и инициирует развитие метастазов. Наравне с этим стали более понятны механизмы экстравазации опухолевых клеток, колонизации ДОК органа-мишени, формирования ими премеастатических ниш и нового опухолевого клона.



**Рисунок 2** – Этапы прогрессии опухоли

На сегодняшний день широко известно, что опухоль, имея нестабильный геном, представлена гетерогенной популяцией клеток, среди которых существуют клоны с более агрессивным фенотипом, дающим им преимущество в выживании в условиях враждебного микроокружения. Одним из компонентов микроокружения опухоли является стромальный компонент, который в результате взаимодействия с

опухолевыми клетками, участвует в формировании васкуляризации опухоли, процессах ее метаболизма, приобретении опухолью дополнительных инвазивных свойств. Это происходит посредством секреции микроокружением различных растворимых факторов, например, таких как интерлейкин-4, интерлейкин-6, колониестимулирующего фактора (SCF-1), факторов роста (EGF, TGF бета) [59, 57, 186, 74, 181].

Один из них, TGF-бета – мощный индуктор эпителиально-мезенхимального перехода, который принято рассматривать как основной ключ к инвазии и метастазированию опухолей, секретируется активированными опухоль-ассоциированными фибробластами. Известно, что активированные фибробласты образуют гетерогенную группу мезенхимальных клеток, которые обычно находятся в микроокружении опухоли. Фибробласты могут располагаться вблизи или внутри метастатических поражений и в ответ на повышенные уровни факторов роста (EGF, FGF, IGF) и присущую опухолевой ткани гипоксию, приобретают воспалительный фенотип, напоминающий фенотип фибробластов при заживлении ран [101, 53]. Встречаются интересные исследования, посвященные изучению взаимосвязей между фибробластами и ДОК. Так, динамические молекулярные взаимодействия между фибробластами и ДОК при различных стадиях метастазирования показаны в исследовании под руководством Rein M. на примере рака молочной железы [138]. Авторы в своем исследовании подчеркивают значимую роль фибробластов в изменении опухолевого микроокружения, что проявляется увеличением его гетерогенности. Они участвуют в ремоделировании внеклеточного матрикса, что происходит посредством синтеза цитокинов, хемокинов (в числе которых: CXCL-9, CXCL-10, CXCL-12, CCL-2), вызывая его перепрограммирование. Этот процесс поддерживается опухоль-ассоциированными макрофагами, продуцирующими ангиогенные факторы роста, металлопротеазы, хемокины [115]. Наряду с этим туморассоциированные макрофаги продуцируют дополнительные факторы, стимулирующие миграцию опухолевых клеток (CXCL-12, интерлейкин-6, TNF) [30, 72].

Значительный вклад в формирование опухолевой среды вносят лимфоциты, в частности популяция Т-регуляторных клеток, присутствие которой вызывает супрессию цитотоксических Т-лимфоцитов и сочетается с усилением ангиогенеза [39]. Рисунок 3. При этом микроокружение поддерживает дифференцировку этих клеток и повышает их супрессорную активность.



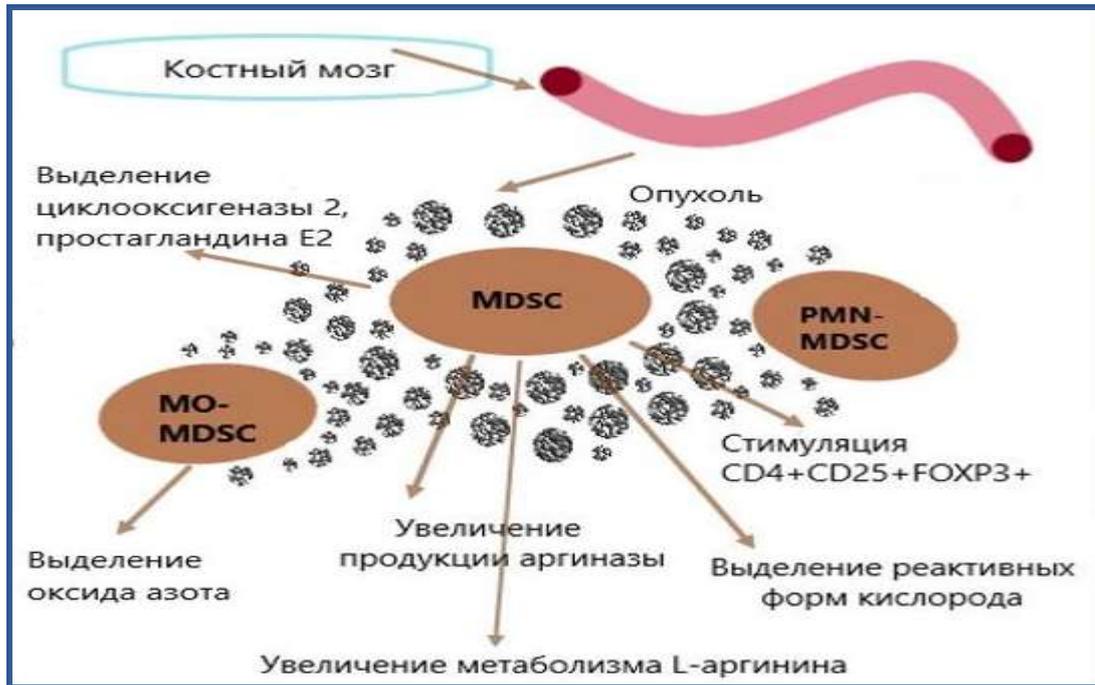
**Рисунок 3** – Эффекты, реализуемые популяцией Т-регуляторных лимфоцитов

Другая субпопуляция Th17лимфоцитов, имеющая общее происхождение с Т-регуляторными лимфоцитами, продуцируя цитокины, различные хемоаттрактанты для многих типов клеток, тем самым стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов, MMP-3, NOS-2, различных проангиогенных факторов [93, 35, 77]

Следует отметить, что продуцируемый данной популяцией IL17, имеет широкий диапазон влияния на формирование микроокружения опухоли, включая взаимодействие со стромальными клетками, а также привлечение, пролиферацию и активацию нейтрофилов.

Широким спектром иммуносупрессирующего влияния отличается популяция супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC), которое

осуществляется посредством изменения метаболизма L-аргинина и выделением реактивных форм кислорода активированными MDSC [76, 83]. Рисунок 4.



**Рисунок 4** – Механизмы иммуносупрессии MDSC

Выделяя ряд растворимых факторов MDSC, способствуют неоваскуляризации опухоли, влияют на CD4+, CD8+цитотоксические Т-лимфоциты, NK, TNK, блокируют созревание дендритных клеток, стимулируют CD4+CD25+Foxp3+Т-лимфоциты. Вместе с тем выработка микроокружением IL13, IL23, MMP, IL17 способствуют и усиливают иммуносупрессивное действие MDSC [79].

Таким образом, иммунокомпетентные клетки, которые рекрутирует опухоль для собственного выживания, запуская разнообразные механизмы уклонения от противоопухолевого ответа организма, занимают одно из ведущих мест в формировании опухолевого микроокружения [102]. Совокупные изменения в стромальном компоненте и генетические трансформации в самих опухолевых клетках обеспечивают процессы метастазирования, колонизации и пролиферации опухолевых клеток в отдаленных органах [119].

Широко известно, что к моменту постановки диагноза большинство больных со злокачественными новообразованиями имеют местно-

распространенный или диссеминированный процесс, нередко сопровождающийся наличием диссеминированных опухолевых клеток, которые могут локализоваться в КМ онкологического больного. На сегодняшний день отработаны высокочувствительные иммунологические методы и накоплен богатый опыт детекции ДОК в КМ, в котором могут определяться как изолированные (одиночные) ДОК, так и их скопления – малые кластеры. Установлена не только возможность количественного определения ДОК, но и их фенотипической характеристики [52].

Важно, что присутствие ДОК в КМ онкологического больного может быть обнаружено даже после радикального хирургического вмешательства, что, по результатам многочисленных научных исследований, создает значительный риск развития метастатической болезни и рецидивов, коррелируя с неблагоприятным прогнозом заболевания. Обнаружение ДОК и их роль как фактора неблагоприятного прогноза показаны при раке молочной железы [19], раке желудка [2], меланоме [52], колоректальном раке [66], раке предстательной железы [104].

В процессе гематогенного метастазирования клетки первичной опухоли выходят в сосудистое русло со скоростью несколько тысяч клеток в день [182], однако, лишь небольшое их количество достигает отдаленных органов. Механизмы, вовлеченные в этот процесс и определяющие его эффективность, довольно разнообразны. И прежде всего, выживание циркулирующих опухолевых клеток определяется их генотипическим преимуществом, что приводит к реализации их метастатического потенциала. Колонизация опухолевыми клетками КМ при солидных опухолях наблюдается довольно часто [22, 19, 52, 127]. Костный мозг – является центральным кроветворным органом, в котором происходит генерация и созревание иммунокомпетентных и гемопоэтических клеток и вместе с тем он служит привлекательной нишей для ДОК. Его особенности строения, такие как развитая сеть синусов и капилляров, насыщенность клеточными элементами и растворимыми факторами (хемокинами, цитокинами, интегринами) создают благоприятные условия для экстравазации

опухолевых клеток и созданию ими своей микросреды. Более 30 лет назад Argüello F. с соавторами (1988) в своем экспериментальном исследовании обратили внимание мирового научного сообщества на то, что именно гемопозитический костный мозг наиболее часто колонизируется опухолевыми клетками. В своей экспериментальной работе они вводили взвесь культуры клеток меланомы B16 в разной концентрации в кровотоки подопытных мышей, что приводило к образованию метастатических очагов в костном мозге даже при низких концентрациях вводимых опухолевых клеток [34].

Следует отметить, что не все ДОК, находящиеся в КМ, жизнеспособны. Подавляющая часть этих клеток погибает, другие могут перейти в состояние опухолевого покоя, которое может продолжаться годами и даже десятилетиями. Костно-мозговое микроокружение – это новая метастатическая ниша, в которой ДОК, обладая особым фенотипом, начинают адаптироваться к ее условиям и формировать ее под свои потребности. Стромальные клетки, компоненты внеклеточного матрикса, различные сигнальные пути, контролирующие нормальную пролиферацию и миграцию стволовых клеток, начинают играть важную роль в инвазии, распространении и приживлении опухолевых клеток [46, 187].

ДОК, существенно нарушая строго контролируемые клеточные и молекулярные механизмы микроокружения, обеспечивают собственное выживание, путем приобретения ими новых фенотипических признаков в процессе клональной экспансии и параллельной прогрессии [154, 145, 94]. Такие микроэволюционные изменения позволяют ДОК избегать локальных и системных воздействий, формируя опухолевый клон с отличительными фенотипическими и генотипическими характеристиками.

Отдельный интерес вызывают ДОК, находящиеся в состоянии покоя, которое получило название «дремлющие метастазы». Они отличаются способностью обратимой остановки роста и устойчивостью к лекарственной и лучевой терапии. Подтверждением того, что большинство ДОК могут находиться в неактивном состоянии, при котором отсутствует их пролиферативная

активность, может служить исследование германских ученых, в котором изучено 532 образца КМ больных раком молочной железы, раком желудка и колоректальным раком. В образцах КМ больных, у которых имелись отдаленные метастазы, в 73,7% случаев обнаружены ДОК. При этом экспрессия антигена Ki-67, который используется для характеристики пролиферативной активности клетки, наблюдалась только в 11 (15,9%) из 69 проанализированных случаев. Последнее указывает на то, что подавляющее большинство ДОК находятся в непролиферирующем состоянии [131, 121].

Pantel К. и соавт. в своем исследовании, чтобы оценить потенциал роста отдельных ДОК, также провели анализ экспрессии антигена Ki-67 фракцией СК18+клеток в КМ больных НМРЛ [126]. Ни в одном из семи проанализированных образцов не выявлено клеток СК18+, коэкспрессирующих антиген Ki-67, о котором известно, что он присутствует во всех фазах клеточного цикла, кроме G0 и G1. (Таблица 3).

**Таблица 3** – Экспрессия различных антигенов ДОК в КМ при НМРЛ

| Антиген               | Количество больных в исследуемой группе (СК18 +клетки) | Количество больных, у которых наблюдалась коэкспрессия исследуемых антигенов СК18+клетками |
|-----------------------|--|--|
| Ki -67                | 7  | 0  |
| P120                  | 10   | 3  |
| p185 <sup>erbB2</sup> | 6  | 5  |

При этом важно отметить, что в КМ присутствовали экспрессирующие Ki-67 «нормальные» клетки, определяемы во всех 7 образцах. Поскольку известно, что нативный белок Ki-67 довольно нестабилен, что может привести к недооценке фактической пролиферативной фракции, авторы дополнительно провели анализ десяти образцов КМ с использованием моноклонального антитела FB2 к ядерному антигену p120. Экспрессия p120 появляется в начале G-фазы и остается в S-фазе. Положительная экспрессия наблюдалась в трех СК18-позитивных случаях из 10. Также авторами предпринята попытка оценить потенциально

релевантные рецепторы факторов роста. Для этого были проанализированы СК18+ клетки на предмет коэкспрессии белка erbB2. Белок erbB2 представляет собой трансмембранную тирозинкиназу Mr 185000 со структурной гомологией к рецептору эпидермального фактора роста. Интересно, что экспрессия белка erbB2 на клетках СК18 + обнаруживалась в пяти из шести проанализированных образцов костного мозга.

Следует обратить внимание, что состояние покоя может быть инициировано сигналами костномозгового микроокружения, которые ДОК получают в ответ на экспрессию различных опухолевых антигенов, либо отсутствием тех сигналов, от которых ранее зависела пролиферативная активность опухолевых клеток [75, 164]. Так, ДОК молочной железы в КМ могут избегать TRAIL-индуцированного апоптоза, поскольку они экспрессируют CXCR4, являющийся лигандом костного цитокина CXCR12, и демонстрируют высокую активность SRC [62]. Описаны цитокины, экспрессия которых активирует сигнальный путь p38MAPK и таким образом вызывает состояние опухолевого покоя ДОК плоскоклеточного рака головы и шеи (TGF- $\beta$ 2), ДОК рака предстательной железы (BMP7) и рака молочной железы (BMP4) [40, 96, 70].

Нарушение состояния покоя ДОК и вступление их в динамическую фазу формирования метастазов может быть вызвано как генетическими, так и эпигенетическими изменениями в самих ДОК, а также в окружающей микросреде или метастатической нише.

Изучение биологических характеристик ДОК обнаруживает особенности данной популяции клеток и раскрывает новые горизонты понимания формирования метастатического опухолевого клона. Установлено, что ДОК являются гетерогенными в отношении экспрессии рецепторов факторов роста, молекул адгезии, протеаз и их индукторов и рецепторов антигенов главного комплекса гистосовместимости, сигнальных киназ, антигенов, ассоциированных с меланомой (MAGE) или активностью теломеразы [128, 129, 98, 132, 95, 177, 80, 173, 146, 142, 116, 140, 112, 113].

Так, показана гетерогенность ДОК меланомы: на своей поверхности ДОК экспрессировали разнообразный набор антигенов (CD57 и CD133) [52], что отличало их от первичной опухоли.

Особое значение имеет рецептор эпидермального фактора роста HER2/neu, экспрессия которого в первичных опухолях предопределяет возможность терапии трастузумабом [141]. В исследовании Braun S. и соавт. (2001) показали, что сверхэкспрессия HER2/neu на ДОК в КМ, являлась предиктором неблагоприятного прогноза у больных раком молочной железы I-III стадии [42]. В другой работе как отрицательный, так и положительный статус Her2/neu в большинстве случаев совпадали у ДОК и первичных опухолей. Вместе с тем, имеются также исследования, указывающие на расхождения между статусом Her2/neu первичной опухоли и ДОК в КМ [42, 131, 163]. Следует отметить, что авторы исследования обращают внимание на то, что экспрессия HER2/neu на ДОК была гетерогенной у отдельных пациентов, что позволяет обратить внимание на эту категорию больных, как потенциальных кандидатов на терапию трастузумабом.

Имеются данные, что ДОК демонстрируют фенотип стволовых клеток. На примере рака молочной железы установлено, что ДОК в КМ имели фенотип CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> / <sup>low</sup>, CK19<sup>+</sup>MUC-1<sup>-</sup> [41, 86, 180]. Данный фенотип ДОК сопряжен с их состоянием покоя, которое обуславливает их устойчивость к системной терапии и длительную персистенцию в КМ онкологического больного [29, 36].

В экспериментальной работе на основе ДОК больных нематастатическим раком (рак молочной железы, предстательной железы и легких) получены клеточные линии, которые экспрессируют маркеры опухолевых стволовых клеток (CD44<sup>high</sup>, CD24<sup>low</sup>) и демонстрируют эпителиально-мезенхимальный фенотип (cytokeratin<sup>low</sup>, EpCAM<sup>low</sup>, vimentin<sup>high</sup>) с экспрессией стрессовых белков, которые позволяют ДОК выживать при гипоксии и химиотерапии [38]. Это дает основание предполагать, что ДОК, по-видимому, оседают в нишах гемопоэтических стволовых клеток, которые расположены в наиболее гипоксических областях.

Интересное исследование проведено под руководством Schoenfeld A. В своей работе авторы в результате транскриптомного анализа остеотропных опухолевых клеток молочной железы, обнаруженных в КМ, установили, что ДОК могут демонстрировать остеобластоподобный фенотип. Эти опухолевые клетки подвергались остеомиметизму в кости путем экспрессии генов, обычно экспрессируемых остеокластами или остеобластами [156]. Таким образом, по мнению авторов, ДОК могут обретать «орган-имитирующий» фенотип [156]. Точные механизмы ЭМТ и МЭП до конца не изучены. Вероятно, опухолевые клетки с самой высокой эпителиально-мезенхимальной пластичностью, являются предшественниками клеток, формирующих опухолевый клон в отдаленных органах, включая КМ [153].

Таким образом, приобретение дополнительных генетических и эпигенетических характеристик ДОК, изменение состояния микроокружения, вовлечение разнообразных иммунных механизмов приводят к их успешной колонизации. Кроме того установлено, что ДОК в костном мозге могут иметь геномные профили, не связанные с первичной опухолью.

Исследования ДОК в КМ больных НМРЛ немногочисленны и посвящены в основном изучению их прогностической значимости. Представлены исследования зарубежных авторов. Отечественных работ в литературе по изучению ДОК в КМ больных НМРЛ не встречается. Выявление ДОК в КМ при НМРЛ проводилось преимущественно иммуноцитохимическим методом с использованием моноклональных антител преимущественно СК2 или САМ2. По данным нескольких исследований частота выявления цитокератин-позитивных клеток у больных НМРЛ колебалась от 22 до 60%. ДОК были обнаружены даже на ранних стадиях НМРЛ. Следует отметить интересное наблюдение. Наиболее часто ДОК в КМ обнаруживались у больных, которым аспирация КМ выполнялась из грудины, по сравнению с теми, у которых забор КМ осуществлялся из гребня подвздошной кости. Сложно прокомментировать с чем это связано.

При сравнении результатов лечения больных НМРЛ, у которых были обнаружены ДОК, с ДОК отрицательными больными оказалось, что присутствие

ДОК в КМ коррелировало с неблагоприятным прогнозом заболевания (Таблица 4). В таблице представлены результаты 9 исследований, выборка которых варьировала от 50 до 350 больных НМРЛ с I-III стадиями опухолевого процесса, демонстрирующие вышеуказанное наблюдение [126, 54, 130, 122, 135, 166, 90, 184, 113]. Показано достоверное ухудшение безрецидивной выживаемости, общей выживаемости при наличии ДОК в КМ больных НМРЛ ( $p < 0,05$ )

**Таблица 4** – Прогностическая значимость обнаружения ДОК при НМРЛ

| Авторы  | Стадия           | n   | Частота обнаружения ДОК | Период наблюдения (мес) | Связь обнаружения ДОК с течением заболевания |
|---|------------------|-----|-------------------------|-------------------------|--|
| Pantel K., Izbicki J.R., Angstwurm M. at al. [126]    | I-III (N0, n=42) | 82  | 22%                     | 13,0                    | RR (67%), p-нет данных                       |
| Cote R.J., Beattie E.J., Chaiwun B. at al. [54]       | I-III            | 43  | 40%                     | 13,6                    | БРВ ( $p < 0,001$ )<br>RR ( $p < 0,001$ )    |
| Pantel K., Izbicki J., Passlick B., at al. [130]      | I-III (N0, n=70) | 139 | 60% (N0:54%)            | 39,0                    | RR ( $p = 0,004$ )<br>при N0                 |
| Ohgami A., Mitsudomi T., Sugio K., at al. [122]       | I-III (N0, n=66) | 139 | 60% (N0:52%)            | 66,0                    | RR ( $p = 0,008$ )                           |
| Passlick B., Kubuschok B., Izbicki J.R. at al. [135]  | I-III (N0, n=23) | 39  | 38%                     | 4,6                     | ОВ ( $p = 0,007$ )<br>при N0, более 2 клеток |
| Sugio K., Kase S., Sakada T., at al. [166]            | I-III (N0, n=40) | 58  | 47%                     | 36,0                    | ОВ ( $p = 0,044$ )                           |
| Kasimir-Bauer S., Schleucher N., Weber R. at al. [90] | I-IV (M1, n=27)  | 80  | 23%                     | 12,0                    | ОВ ( $p = 0,030$ )                           |
| Yasumoto K., Osaki T., Watanabe Y. at al. [184]       | I-III            | 351 | 32%                     | 48,0                    | ОВ ( $p = 0,047$ )<br>при II-III             |

|  |                  |    |     |  |                        |
|--|------------------|----|-----|--|------------------------|
| Sienel W.,<br>Mecklenburg I.,<br>Dango S. at al. [113] | I-III, M0,<br>R0 | 50 | 52% |  | RR (p <0,03)<br>при N0 |
|--|------------------|----|-----|--|------------------------|

**n** - количество больных, **OB** – общая выживаемость, **БРВ** – безрецидивная выживаемости, **RR**- частота рецидива.

Интересно отметить, что RT-PCR (reverse transcription-PCR) метод для обнаружения ДОК в КМ использовался в единичных исследованиях. В своей работе Sienel и соавт. методом RT-PCR обнаружили транскрипты MAGE-A в 50 случаях (52%) неметастатического НМРЛ [113]. Кроме того, этими авторами установлена корреляция между клинико-морфологическими признаками опухоли и наличием ДОК в КМ больных НМРЛ, что согласуется с двумя другими исследованиями (Таблица 5).

При изучении зависимости поражения КМ от размера опухоли (символ T), статуса лимфатических узлов (символ N), степени дифференцировки НМРЛ Sienel W. и соавт. выявили, что наличие ДОК в КМ связано с дифференцировкой опухоли и ее размером. По результатам проведенного анализа ДОК значительно чаще выявлялись (32%) в КМ при более дифференцированных опухолях (G1-G2), чем при опухолях с низкой дифференцировкой (4%) G3- G4, (p =0,03).

Интересные данные получены этими авторами относительно статуса лимфоузлов. Наличие поражения КМ у больных с N0 статусом было достоверно связано с развитием рецидива: n = 1(17%) против n = 8 (80%), p = 0,03, относительный риск 7,6. Корреляции между выживаемостью и ДОК статусом в общей популяции больных не было установлено, но в группе больных с N0 статусом была тенденция к снижению выживаемости: 25% у пациентов с ДОК положительным КМ и 43% у пациентов с ДОК отрицательным КМ (P = 0,67).

**Таблица 5** – Исследования, в которых установлена взаимосвязь обнаружения ДОК с клинико-морфологическими характеристиками НМРЛ

| Исследование   | Стадия                 | Количество больных | Частота обнаружения ДОК | Характеристики опухоли                                  |
|--|------------------------|--------------------|-------------------------|---|
| Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm et al. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. Germany. [126]   | I-III<br>(N0,<br>n=42) | 82                 | 22%                     | Степень дифференцировки G3 (35%), размер опухоли (T3-4) |
| Yasumoto K, Osaki T, Watanabe Y. et al. Prognostic value of cytokeratin-positive cells in the bone marrow and lymph nodes of patients with resected nonsmall cell lung cancer: a multicenter prospective study. Japan. [184] | I-III                  | 351                | 32%                     | Размер первичной опухоли                                |
| Sienel W., Mecklenburg In., Dango S., et al. Detection of MAGE-A Transcripts in Bone Marrow Is an Independent Prognostic Factor in Operable Non-Small-Cell Lung Cancer. Germany. [113]                                       | I-III,<br>M0, R0       | 50                 | 52%                     | Степень дифференцировки G1-G2 (32%), размер опухоли     |

Анализ взаимосвязи поражения КМ и клинико-морфологических характеристик опухоли также провели Pantel К. и соавт., которые изучили 82 образца КМ больных НМРЛ с I-III стадиями (Таблица 5). В своей работе они получили результаты аналогичные вышеописанному наблюдению. Частота выявления ДОК в КМ больных НМРЛ в данной работе составила 22% [126]. Кроме этого, при анализе ДОК статуса в зависимости от дифференцировки опухоли они показали, что при низкодифференцированном раке (G3) ДОК в КМ больных НМРЛ обнаруживались чаще - в 35% (11 из 31) случаев ( $p < 0,05$ ). Также в данной работе установлена взаимосвязь между размером первичной опухоли (Т)

и наличием ДОК в КМ: при большем размере опухоли (Т3-4) ДОК выявлялись достоверно чаще.

Схожие результаты представлены в мультицентровом исследовании, которое включало 351 больного НМРЛ с I-III стадией [184]. В данной работе ДОК были обнаружены у 112 пациентов (31,9%) из 351 пациента, при этом у 34 из 216 пациентов (15,7%) с I стадией опухолевого процесса микрометастазы (RT-PCR) были обнаружены в медиастинальных лимфоузлах. Присутствие ДОК на ранних стадиях, по мнению авторов, поддерживает концепцию того, что опухолевые клетки приобретают генетические изменения, связанные с их метастатическим потенциалом, на ранних стадиях канцерогенеза. По результатам анализа выживаемости авторами установлено, что в группе ДОК позитивных больных имеется тенденция к сокращению общей выживаемости по сравнению с ДОК негативной группой больных ( $p=0,076$ ). Значительное снижение общей выживаемости наблюдалось у пациентов со стадиями II-IIIА. Пациенты, у которых микрометастазы (RT-PCR) выявлены в регионарных лимфатических узлах имели плохой прогноз, что установлено в результате как однофакторного ( $p = 0,004$ ), так и многофакторного анализа ( $p = 0,018$ ) [184].

Таким образом, более половины опубликованных на сегодняшний день исследований о прогностической роли ДОК при НМРЛ, обнаружили связь между наличием поражения КМ и ухудшением общей выживаемостью или высокой частотой рецидивов. Поэтому одним из важнейших вопросов, от которого зависит выбор адекватного лечения больного и положительный исход заболевания, является вопрос диагностики метастатического поражения до клинического проявления. Вместе с тем идентификацию ДОК в КМ больных НМРЛ необходимо рассматривать не только с позиций скрининга больных для выбора тактики лечения, но и с точки зрения потенциальной мишени для новых подходов в лекарственной терапии.

#### **1.4. Основные субпопуляции лимфоцитов костного мозга**

КМ является центральным лимфоидным органом, в котором происходит генерация незрелых лимфоидных предшественников, созревание основных

лимфоцитарных популяций, участвующих в системе противоопухолевого иммунного ответа, как врожденного так и приобретенного. Популяции лимфоидных клеток КМ, на долю которых приходится 10-15%, довольно гетерогенны и представлены Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами, НК-клетками и их субпопуляциями, которым в последнее время уделяется значительный научный интерес. Содержание лимфоидных клеток взрослого индивида достигает  $2 \times 10^{12}$ , при этом 20% из них циркулирует в периферической крови [8].

Популяции зрелых Т-лимфоцитов КМ, несущие маркеры зрелых клеток (CD3+), составляя не более 30% от общего числа лимфоидных клеток и продуцирующие широкий спектр растворимых факторов, выполняют разнообразные функции, включающие контроль дифференцировки и пролиферации гемопоэтических клеток. Среди зрелых Т-лимфоцитов выделяют две основные субпопуляции: CD4+, обладающие как регуляторными, так и эффекторными свойствами, и CD8+ цитотоксические лимфоциты. Зрелые Т-клетки довольно широко изучаются в периферической крови, опухолевом микроокружении. Большое внимание на сегодняшний день уделяется популяции CD4+клеток, которая оказалась весьма гетерогенной.

CD4+ Т-лимфоциты (хелперы), сложная и интересная популяция клеток, которая реализуют противоопухолевый ответ посредством разнообразных механизмов, включающих индукцию Th1 и Th2 ответов и цитотоксические реакции [85, 51]. Th-1 хелперы, как известно, это клетки, осуществляющие свою роль в местных воспалительных реакциях, защищая организм от внутриклеточных патогенов и опухолевых клеток, в то время как участие Th-2 хелперов необходимо для осуществления гуморального иммунного ответа, протекающего с участием В-клеток. Именно IL-4, продуцируемый популяцией Th-2 хелперов, способствует активации В-клеток и усилению антителобразования.

При различных иммунных реакциях выявляются CD4+Т-клетки с цитотоксической активностью, которые играют важную роль и в противовирусном, и в противоопухолевом иммунитете. Интересно, что эти клетки характеризуются способностью распознавать опухоль-ассоциированные антигены

в комплексе с антигенами главного комплекса гистосовместимости II класса, секретировать гранзим В и перфорины [168]. Они могут развиваться из эффекторных подгрупп Th0, Th1, Th2, Th17 и Treg. Однако, большинство из них близки Th1-клеткам, и секретируют TNF-альфа, IL-2, интерферон- $\gamma$ . Поскольку известно, что дифференцировка Th1 регулируется фактором транскрипции T-bet, который также индуцирует продукцию IFN $\gamma$ . T-bet также индуцирует экспрессию гранзима В и перфорины, которые необходимы для осуществления цитотоксической активности [168]. Обнаружен подкласс наивных Т-клеток, способных дифференцироваться в CD4-цитотоксические лимфоциты [111].

Лимфоциты Th-17 – субпопуляция CD4+ цитотоксических лимфоцитов, продуцирующая разнообразные цитокины и хемоаттрактанты для других типов клеток, участвующих в формировании микроокружения опухоли, способствует усилению роста опухоли и неоваскуляризации посредством продукции IL-17. Известно, что IL-17 повышает выделение различных проангиогенных факторов фибробластами и опухолевыми клетками. Вместе с тем наблюдается синергичное действие Th-17-клеток с CD4+CD25+Т-лимфоцитами [58].

В своем исследовании Duan M.C. и соавторы изучили уровни субпопуляции Th17 CD4+ цитотоксических лимфоцитов и CD4+CD25+ Foxp3+Т-регуляторных клеток при НМРЛ. Изучалась периферическая кровь 19 больных НМРЛ и 19 здоровых доноров. Установлено, что количество Th17 CD4+лимфоцитов было повышено в образцах крови больных, что отрицательно коррелировало с активацией Foxp3 и ROR $\gamma$ t. Кроме того, авторами отмечено повышенное соотношение Th17/Т-регуляторных клеток по сравнению со здоровыми донорами. Интересно, что соотношение Th17/Т-регуляторных клеток положительно коррелировало с концентрациями СЕА (carcinoembryonic antigen) у больных НМРЛ [61].

Большой интерес представляет CD27 популяция CD4+цитотоксических лимфоцитов. Молекула CD27, обеспечивающая костимуляторный сигнал, играет важную роль в активации Т-клеток [155]. Связывание ее с лигандом CD70 приводит к усилению пролиферации и дифференцировки Т-клеток в эффекторные

и клетки памяти, на которых возможна коэкспрессия гранзима В, перфорина [55]. В исследованиях на мышинных моделях показано, что усиление сигнала CD27\CD70 способствует противоопухолевому иммунному ответу. Использование агониста CD27 приводит к экспансии Т-клеток *in vitro* [78]. Важно, что, подобно OX40, CD27 экспрессируется как эффекторными, так и регуляторными популяциями Т-клеток в опухолевой ткани, что позволяет рассматривать CD27+ популяцию как потенциальную мишень для терапии [155].

Широко изучаются клетки с фенотипом CD4+CD25+Foxp3+, так называемые регуляторные Т-клетки. Они представлены такими клетками как Th3, Th1, характеризующиеся продукцией различных цитокинов (TGFбета, IL-10) [134]. Данная популяция, экспрессируя Foxp3+, способствующий дифференцировке этих клеток, отличается иммуносупрессивным потенциалом, реализация которого препятствует осуществлению цитотоксического эффекта киллерных клеток [178]. Они могут подавлять пролиферативную и функциональную активность различных иммунокомпетентных клеток, включая CD4+ и CD8+Т-клетки. Механизмы, обеспечивающие данный процесс, довольно разнообразны и включают в себя как прямой цитолиз Т-эффекторных клеток, так и опосредованное воздействие путем синтеза ингибиторных цитокинов (IL-10, IL-35, TGF-бета) или конкурентного связывания IL-2, CTLA-4 зависимого трогоцитоза на дендритных клетках [152, 183].

Исследования регуляторных CD4+CD25+Foxp3+клеток в периферической крови при различных опухолях свидетельствуют об увеличении их уровня, что коррелирует с увеличением размеров опухоли, усилением неоваскуляризации, прогрессированием опухолевого процесса [56, 50, 114]. Сообщается, что и при НМРЛ имеется выраженная инфильтрация Т-регуляторными клетками опухоли, лимфатических узлов, а также высокие уровни этих клеток в КМ и в крови [176].

По результатам проведенного исследования Ye L. и соавт. установлено, что количество Т-регуляторных клеток (CD4+CD25+ CD127-) в периферической крови больных НМРЛ было значительно повышено на поздних стадиях по сравнению с контрольной группой (8,9% против 5,4%  $p < 0,05$ ). При этом следует

отметить, что наблюдалось значительное увеличение их количества у больных с IV стадией по сравнению с пациентами с IIIa или IIIb стадиями НМРЛ [185]. При этом уровни всей популяции CD4+клеток при IV стадии были снижены (41,7% против 39,7%,  $p < 0,05$ ). Похожие результаты исследований получены при НМРЛ распространенных стадий и другой группой ученых [84].

В своей работе Chen C. и соавт. изучили CD4+CD25+FOXP3+ и CD8+CD28- регуляторные Т-клетки в периферической крови 49 больных НМРЛ после хирургического вмешательства. У больных по сравнению с контрольной группой (незлокачественные заболевания) выявлено более выраженное количество клеток данных популяций, причем их содержание увеличивалось с увеличением стадии опухолевого процесса. Кроме того, авторами проведен анализ взаимосвязи этих популяций с гистологическим видом НМРЛ: существенной разницы между плоскоклеточным раком и аденокарциномой не установлено. Уровни CD4+CD25+FOXP3+ и CD8+CD28- регуляторных Т-клеток были значительно снижены после операции. При этом количество Т-регуляторных клеток после операции у больных III-IV стадией было больше по сравнению с контрольной группой, в то время как при ранних стадиях этого не отмечено [50].

В литературе описаны наблюдения, которых сообщается о прогностической значимости CD4+популяции Т-клеток. Исследование проводилось у больных местно-распространенным трижды негативным раком молочной железы. Повышенные уровни этой субпопуляции в периферической крови установлены у больных до лечения по сравнению с контролем. В группе больных, у которых имелась 1-2 степень патоморфоза они составляли  $49,1 \pm 11,2$  %, а в группе с 3-4 степенью -  $38,0 \pm 5,0$  % ( $p = 0,036$ ). Выживаемость общая, а также выживаемость без прогрессирования достоверно была лучше у больных раком молочной железы, имевших повышенные уровни CD4+популяции Т-клеток [27].

Многофакторный анализ выживаемости у больных НМРЛ, проведенный Liu C. и соавт., показал, что увеличение содержания популяции наивных CD4+ Т-клеток являлось независимым фактором благоприятного прогноза: общая

выживаемость у больных была лучше. Следует отметить, что эти результаты касались популяции курящих пациентов [107].

Интересные данные в литературе описаны, касающиеся изучения опухолевого микроокружения. По результатам многих научных исследований сообщается, что среди опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов содержание Т-регуляторных клеток увеличено и составляет до 15 % от популяции CD4 +Т-клеток, что коррелирует с неблагоприятным прогнозом при ряде злокачественных опухолей [31, 118, 110, 188]. Следует отметить, что микроокружение опухоли во многом определяет фенотип CD4 +Т-клеток и их функциональную активность, способствуя поддержанию супрессивного потенциала, посредством присутствия в опухолевой ткани незрелых дендритных клеток, а также продуцируемых Th2-клетками цитокинов [88]. Также важно, что детальное изучение опухолевой инфильтрации показывает, что как внутриопухолевая, так и перитуморальная инфильтрация CD4+CD25+Foxp3+ клетками с иммуносупрессорной активностью ассоциируется с ухудшением течения болезни.

В литературе встречается несколько исследований, посвященных изучению популяций иммунокомпетентных клеток в КМ при отдельных видах злокачественных опухолей. Результаты проведенного исследования при саркомах у детей, свидетельствуют о важной роли популяций Т-лимфоцитов в процессах гематогенного метастазирования [5]. Авторами показано, что у детей с рабдомиосаркомой увеличено содержание в КМ фракции активированных цитотоксических Т-клеток (28,7% против 8,9%  $p=0,004$ ) по сравнению с нормой, при этом отмечено, что уровни популяции CD4+клеток снижены почти в два раза. Аналогичные данные получены при исследовании КМ у детей с Саркомой Юинга. Также авторы в своем исследовании установили достоверные отличия содержания субпопуляций КМ в зависимости от факторов прогноза. При распространенных опухолях по сравнению с локализованным процессом уровни зрелых CD62L-позитивных Т-лимфоцитов были повышены.

В нескольких работах, посвященных раку молочной железы, также отмечено изменение субпопуляционного состава лимфоцитов КМ по сравнению с

нормой. В исследовании Feuerer M. и соавт. показано, что в КМ увеличено содержание эффекторов противоопухолевого иммунитета: пропорция Т-клеток памяти среди Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> была намного больше у больных по сравнению со здоровыми донорами [64].

E. F. Solomayer et al. сравнили субпопуляционный состав лимфоцитов КМ доноров и больных РМЖ: оказалось, что количество зрелых Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) у больных снижено в сравнении с нормой (30,6% против 40,8 %) [162]. Однако, в другом исследовании, посвященном сравнению лимфоцитарных популяций КМ при раке молочной железы и мастопатии подобной закономерности не отмечено: уровни CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов при раке и доброкачественных процессах составляли по 58% [7]. В работе Мкртчян В.А. и соавт. также исследовали уровни зрелых Т-лимфоцитов костного мозга у больных раком молочной железы [17]. Авторы провели анализ субпопуляций в зависимости от пролиферативного индекса Ki-67. Оказалось, что содержание субпопуляций зрелых Т-клеток не отличалось при разных показателях индекса пролиферативной активности опухолевых клеток.

Цитотоксические CD8<sup>+</sup>лимфоциты представляют собой гетерогенную популяцию клеток и играют особую роль в системе адаптивного иммунитета, обеспечивая защиту организма от вирусов и опухолевых клеток [33]. Являясь эффекторными клетками они несут на своей поверхности перфорины и гранзимы, необходимые для реализации их основной задачи-цитотоксического эффекта. На сегодняшний день описаны несколько видов CD8<sup>+</sup> лимфоцитов: CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> CD12<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> клетки [108]. В экспериментальных моделях выявлены некоторые особенности одной из субпопуляций: CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> могут проявлять как эффекторные свойства, так и супрессивные. Установлено, что они могут продуцировать разные группы цитокинов: IL-10, IL-4, TGF бета, INF альфа, гамма [65].

Проведенное исследование популяции CD8<sup>+</sup> клеток в первичной опухоли, лимфатических узлах и периферической крови при разных злокачественных опухолях выявило выраженную пропорцию CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, которая демонстрировала выраженные супрессивные свойства. В эксперименте

CD8+CD28- клетки, которые были выделены из первичной опухоли, метастатически измененных лимфоузлов, а также периферической крови больных, подавляли пролиферативную и цитотоксическую активность Т-клеток *in vitro* [65].

Вместе с этим авторами был проведен анализ супрессорной активности CD8+CD28-клеток в зависимости от клинических параметров. Установлена прямая корреляция супрессорной активности этих клеток со стадией заболевания ( $p=0,01$ ). При этом продолжительность жизни больных обратно коррелировала с активностью CD8+CD28-клеток ( $p=0,0001$ ). Полученные данные перекликаются с результатами других исследователей. Так, группой ученых под руководством Karagoz В. проведено исследование CD8+CD28- клеток и CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток в периферической крови больных диссеминированным раком легкого [89]. В исследовании приняли участие 28 больных с III-IV стадией немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких. Методом проточной цитометрии были изучены CD3+, NK, CD4+CD25 Treg-клетки, субпопуляции CD8+клеток. Увеличение содержания популяции CD4+CD25+ выявлено у больных раком легкого по сравнению со здоровыми донорами. Кроме того, установлено, что уровни содержания популяции CD8+CD28-Т-клеток у больных НМРЛ были увеличены в сравнении с контрольной группой. Также отмечено повышение соотношения CD28-/CD28+ -клеток [89].

В другой работе изучена данная популяция клеток у больных первично-операбельным раком молочной железы. Авторы обнаружили, что уровень субпопуляции CD8+CD28-Т-клеток был повышен у 40% больных, при этом эти изменения установлены только при I-II стадии опухолевого процесса. Вместе с тем в исследовании были проанализированы уровни содержания этих клеток в зависимости от эффективности проводимой химиотерапии. Оказалось, что процент этих клеток снижается после химиотерапии у больных с высокой степенью лекарственного противоопухолевого ответа. В результате авторы пришли к выводу, что снижение количества CD8+CD28-Т-клеток на фоне лекарственного лечения ассоциируется с благоприятным прогнозом рака молочной железы [10].

Интересное исследование прогностического значения популяции CD8+CD28+Т-клеток и CD8+CD28- Т-клеток проведено у больных НМРЛ, получавших химиотерапию, в котором также изучена взаимосвязь этой популяции с гистологическим типом опухоли. По результатам многофакторного анализа оказалось, что повышение уровня CD8+CD28+Т-клеток независимо предсказывало благоприятную общую выживаемость ( $p=0,021$ ) и выживаемость без прогрессирования ( $p=0,038$ ) при аденокарциноме. Повышенное содержание популяции CD8+CD28-Т-клеток являлось неблагоприятным фактором прогноза ( $p=0,035$  и  $p=0,029$ ) при плоскоклеточном раке. При аденокарциноме отмечены более высокие уровни CD4+CD25+ Т-клеток и CD8+CD28- Т-клеток и более низкие уровни НК-клеток ( $p < 0,05$ ), чем при плоскоклеточном раке [106]. В другой работе значимость CD8+CD28+ популяции клеток как независимого фактора прогноза показана у больных НМРЛ, подвергнувшихся радиотерапии: увеличение пропорции этих клеток предсказывает хороший ответ на лечение [105].

Важным клеточным звеном в противоопухолевом иммунитете являются НК-клетки (CD3-CD56+CD16+). Содержащие в своем арсенале перфорины и гранзимы, распознавая липидные и гликолипидные антигены, продуцируя различные цитокины, они могут функционировать как эффекторы 1 или 2 типа [9]. Активированные IL-12, выделяемым дендритными клетками в ответ на взаимодействие с патогеном, НК-клетки реализуют свой ответ в качестве эффектора 1 типа. Однако малое содержание их в опухолевом микроокружении склоняет ученых к мнению, что их значимая роль сводится к поддержанию взаимодействий между дендритными и Т-клетками [179]. Продуцируя разнообразные хемокины (CCL3 (MIP1- $\alpha$ ), CCL4 (MIP1- $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CCL22, XCL1 (лимфотактин) и CXCL8 (IL-8)), НК-клетки влияют на активность киллерных клеток и других гемопоэтических клеток при различных патологических состояниях [1, 171].

Известные на сегодняшний день исследования демонстрируют, что НК-клетки могут не только стимулировать противоопухолевый ответ, но и оказывать

иммуносупрессивное действие, проявляя себя как эффекторы 2-го типа и продуцируя IL-4, IL-13, интерферон-гамма [172]. Неблагоприятное прогностическое значение популяции CD3+CD8+CD16+ NKT клеток выявлено при меланоме. Иные данные получены при раке молочной железы [10].

Уровни популяции NK клеток при НМРЛ изучались Ye L. и соавт., которые исследовали образцы периферической крови 83 больных с установленными III-IV стадиями опухолевого процесса. По сравнению со контрольной группой уровни NK-клеток периферической крови пациентов НМРЛ были снижены ( $p < 0,05$ ). Причем значительное снижение уровня этой популяции отмечено у больных НМРЛ с IV стадией [185].

Интересные работы встречаются по изучению костномозговых популяций NK-клеток. В исследовании, в котором оценивались уровни популяции NK-клеток при раке молочной железы было выявлено, что в КМ увеличено не только количество CD56+клеток, но и их субпопуляций: CD56+, экспрессирующих маркер ранней активации CD69 или маркер CD45RO, который указывает на их пролиферативную активность [64].

В исследовании других авторов, изучивших популяции NK-клеток КМ у 67 больных раком молочной железы и 13 пациенток с доброкачественными новообразованиями, отмечено, что уровни субпопуляции CD16+CD3- NK клеток больных были выше чем при доброкачественных процессах (14,9% против 8,9 %,  $p = 0,046$ ), хотя достоверных различий по субпопуляции CD56+CD3- NK-клеток установлено не было ( $p > 0,05$ ) [7]. Другими авторам были проанализированы не только содержание субпопуляций NK-клеток в КМ, но и изучена их взаимосвязь с биологическими характеристиками опухоли. Показано, что NK-клетки обеих субпопуляций преобладают у больных раком молочной железы, который характеризуется низкой пролиферативной активностью [17].

Популяции костномозговых NK-клеток изучены при саркомах. Показано, что при распространенных стадиях рабдомиосаркомы у детей по сравнению с локализованными опухолями уровни NK-клеток достоверно снижены [6].

Значительную роль в противоопухолевом ответе играет популяция В-лимфоцитов. В-клетки составляют примерно 5-15% циркулирующих лимфоцитов и порядка 5% в нормальном костном мозге. Зрелые В-клетки (CD20+), экспрессирующие на своей поверхности CD5, представляют собой популяцию В1-клеток, продуцирующую более половины сывороточного IgM, играющего ключевую роль в индукции апоптоза опухолевых клеток. Эти антитела, распознавая опухольассоциированные антигены, транспортируют в опухолевые клетки липиды, реализуя программу липоапоптоза [20].

В своей работе Григорьева Т. А. и соавт. изучили популяции В –лимфоцитов КМ больных раком молочной железы. Интересные данные получены при анализе взаимосвязи между популяцией лимфоцитов КМ и гистологическим видом опухоли. Выявлено, при инфильтративно-протоковом раке в сравнении с инфильтративно-дольковым раком увеличено содержание CD10+В-лимфоцитов (16,3% против 6,98 %,  $p = 0,029$ ) [7].

Изучение популяции В-лимфоцитов и их субпопуляций (CD27+CD38+/- В-клеток, а также плазматических клеток CD27+CD38++) в образцах опухоли, здоровой ткани и в периферической крови больных НМРЛ проведено Stankovic B. и соавт. Обнаружено, что CD19+В-клетки составляли в среднем 18% от всех CD45+ лимфоцитов при аденокарциноме и 12,7% при плоскоклеточном раке. Проведенное авторами сравнение процентного содержания В-клеток в разных образцах ткани выявило выраженную инфильтрацию опухоли CD19+В-клетками по сравнению со здоровой тканью, причем эти изменения наблюдались как при аденокарциноме ( $p < 0,0001$ ), так и при плоскоклеточном раке ( $p = 0,007$ ). Повышенное содержание В-клеток в опухоли, по мнению авторов, может быть за счет увеличения пропорции CD27+CD38+/- В-клеток, поскольку количество CD27+CD38++ плазматических клеток был одинаковым в опухоли и здоровой ткани. Интересно, что при плоскоклеточном раке содержание субпопуляции IgM+IgD- В-клеток было более выраженным [165].

Увеличение инфильтрации В-клетками опухолевой ткани при НМРЛ по сравнению со здоровой тканью (39% против 5%) также отмечено в исследовании

Banat G.A. [37]. Причем, присутствовала корреляция степени инфильтрации опухоли CD20+клетками со стадией опухолевого процесса: количество CD20+клеток было больше при стадии III НМРЛ по сравнению с I стадией (75% против 9%). Взаимосвязи с размером опухоли и ее гистологическим видом не установлено. Обращает на себя внимание, что при стадии N0 отмечена более выраженная инфильтрация (45%) CD20+клетками чем при N1-2 (29%) [103].

Таким образом, изучению субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных отводится важное значение. Исследования направлены на анализ популяций лимфоцитов, как циркулирующих в периферической крови, так и инфильтрирующих опухоль. Особое внимание в последние десятилетия уделяется изучению лимфоцитарных популяций КМ, что существенно изменяет взгляд на концепцию взаимодействия опухоли и иммунной системы. Открываются совершенно новые аспекты противоопухолевого ответа, которые выявляют двойственный характер этих взаимодействий. Следует отметить, что по результатам ряда исследований субпопуляций лимфоцитов КМ становится очевидно, что также важным является изучение субпопуляций лимфоцитов у онкологических больных при наличии поражения КМ. Данные нескольких работ свидетельствуют, что иммунокомпетентные клетки в КМ могут играть важную роль в предотвращении развития микрометастатических очагов [47]. Имеются исследования, сообщающие об изменении пропорции популяций лимфоцитов КМ у больных при наличии в нем ДОК. Так, уровни субпопуляций CD4+, CD8+, CD56+ выше в случаях поражения КМ [64]. В работе других ученых получены противоположные данные в отношении CD8+клеток [19]. Авторами изучены образцы КМ больных раком молочной железы. Оказалось, что уровень CD8+лимфоцитов в КМ больных раком молочной железы был достоверно ниже и составлял 39,2% против 48,1% у больных, у которых поражение КМ отсутствовало ( $p=0,011$ ). Результаты этих работ заставляют задуматься, что вполне вероятно персистенция ДОК в КМ в значительной степени зависит от показателей костномозгового микроокружения.

### 1.5. Состояние гемопоэза у онкологических больных

Изменения кроветворения у онкологических больных уже давно привлекает внимание ученых, поскольку многообразие растворимых факторов, продуцируемых опухолью, запускает каскад сложных биологических реакций, влияющих на все системы и органы, в числе которых находится и КМ. Поэтому одним из важных научных направлений на сегодняшний день становится детальное изучение показателей костно-мозгового кроветворения, что приобретает особое значение при наличии поражения КМ.

В литературе встречается немного работ, посвященных этой теме. В нескольких исследованиях обсуждаются изменения гранулоцито- и эритропоэза, установленные при раке молочной железы. Отмечено, что у 80,5% больных присутствует снижение уровня популяций базофильных и у 53,2% больных полихроматофильных форм, при этом у 67,7% больных наблюдается увеличение уровня оксифильных нормобластов [17]. Вместе с этим авторами установлены случаи (32,3%) снижения суммы клеток эритроидного ростка.

Крохина и соавт. также указывают на особенности кроветворения, которые наблюдались у больных раком молочной железы [13]. В своей работе у ряда больных авторы отмечают наличие моноцитоза и лимфоцитоза. Кроме того авторами описано, что поражение КМ сопровождается снижением клеточности КМ, увеличением числа плазматических клеток.

Похожие результаты представлены в работе, посвященной изучению особенностей гемопоэза у больных раком головы и шеи [21]. Авторами выявлено увеличение содержания зрелых клеток гранулоцитарного ростка при снижении молодых форм (промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов), а также отмечено увеличение лейко-эритробластического соотношения. При этом наблюдается снижение клеточности КМ (почти в половине случаев), увеличивается количество лимфоцитов, моноцитов, отмечается уменьшение числа базофильных и полихроматофильных нормобластов, повышение уровня оксифильных форм. При метастатическом поражении КМ авторы отмечают повышение уровня клеток

гранулоцитарного роста и снижение полихроматофильных форм эритроидного роста (7,3% против 13,6%,  $p < 0,05$ ) [21].

Рябчиков Д.А. и соавт., изучая особенности гемопоэза у больных люминальным раком молочной железы, установили, что наличие ДОК в КМ сопряжено с низкой клеточностью КМ. Содержание миелокариоцитов было в 1,6 раз достоверно ниже, чем при отсутствии ДОК:  $57,5 \pm 6,5$  тыс/мкл против  $94,9 \pm 11,6$  тыс/мкл у больных с ДОК-отрицательным статусом ( $p = 0,007$ ) [19]. Аналогичные результаты исследований получены в работе Богомоловой О.А.: сниженная клеточность при наличии поражения КМ отмечалась у 36,4% больных против 25,6% при отсутствии ДОК. Кроме этого, автором отмечено достоверное повышение уровня лимфоцитов (63,6 против 30,8%,  $p = 0,048$ ), тенденция к снижению лейко-эритробластического соотношения и увеличению уровня содержания моноцитов при наличии ДОК в КМ. Моноцитоз более чем в половине случаев отмечен в группе больных, у которых ДОК в КМ отсутствовали (53,8% против 18,2%) [4]

Исследования КМ при меланоме также установили ряд особенностей гранулоцито- и эритропоэза [52]. Авторами выполнен анализ показателей миелограмм больных меланомой, к которым установлено наличие в КМ ДОК. В группе больных, у которых имелось поражение КМ, наблюдалось снижение суммы клеток гранулоцитарного роста (65,4% против 60,7%,  $p = 0,025$ ), снижение оксифильных нормобластов (6,2% против 9,0%,  $p = 0,006$ ) по сравнению группой без ДОК [52]. Кроме того отмечено, что лейко-эритронормобластическое соотношение было более высокое (5,58 против 4,0,  $p = 0,034$ ) при наличии поражения КМ.

Подводя итог, следует отметить, что установленные в ряде работ изменения показателей гемопоэза при различных злокачественных опухолях свидетельствуют о вовлеченности КМ в сложные отношения опухоли и организма больного. Изучение костно-мозгового кроветворения позволяет глубже понять не только особенности регуляции гемопоэза при злокачественном процессе, но и, возможно, обнаружить отдельные особенности разных нозологических видов

опухолей. Это подчеркивают важность дальнейшего изучения всех аспектов кроветворения у онкологических больных.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Характеристика клинического материала больных НМРЛ

В настоящее исследование включено 68 больных НМРЛ, которые обследованы в поликлинике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ. Лечение больных проводилось в хирургическом торакальном отделении НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Сроки проведения исследования составили 2 года: с 2018 по 2019 гг.

Распределение пациентов по полу и возрасту представлено в таблице 6. Среди всех пациентов мужчин было 52 (76,5%), женщин -16 (23,5%). Средний возраст которых составил: 63,3 и 62,4 года соответственно.

**Таблица 6 – Распределение больных НМРЛ по полу и возрасту**

|   | <b>Пол больных</b>                   |          | Всего |
|---|--------------------------------------|----------|-------|
|   | Мужской                              | Женский  |       |
| <b>Относительное количество больных (%)</b> | 76,5                                 | 23,5     | 100   |
| <b>Абсолютное количество больных</b>        | 52                                   | 16       | 68    |
|   | <b>Возраст больных<br/>17-80 лет</b> |          |       |
| <b>M±m</b>                                  | 63,6±1,3                             | 62,4±2,2 |       |

Диагноз НМРЛ установлен всем больным на основании комплексного обследования, которое включало в себя сбор жалоб и анамнеза, физикальный осмотр, с пальпацией надключичных и подключичных лимфатических узлов, аускультацию. Комплексное инструментальное обследование было направлено на оценку характеристик первичной опухоли в легком, ее местную распространенность, а также наличие или отсутствие отдаленных, гематогенных метастазов. Комплекс инструментальных диагностических методик включал:

1. Рутинные анализы крови, мочи;
2. Рентгенологическое исследование и КТ органов грудной клетки;
3. Фибробронхоскопию с биопсией;

4. УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства, лимфатических узлов шейных и надключичных областей;
5. КТ органов брюшной полости и забрюшинного пространства;
6. МРТ головного мозга;
7. Радиоизотопное исследование костей скелета;
8. Цитологическое\гистологическое исследование.

По результатам обследования у 28 (41,2%) больных диагностирован центральный рак легкого, в 40 (58,8%) наблюдениях - периферический. Данные представлены в таблице 7. Центральный НМРЛ преимущественно наблюдался у мужчин (96,2%, n=27) и женщин 3,8% (n=1), тогда как периферическая форма отмечена у 64,3% (n=25) больных мужского пола и 35,7% (n=15) больных женского пола.

**Таблица 7** – Распределение больных НМРЛ в зависимости от клинико-анатомической формы

| Клинико-анатомический вид НМРЛ | Количество больных, %  |                        |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|
|                                | Центральный            | 41,2 (n=28)            |
| Мужчины<br>96,2 (n=27)         |                        | Женщины<br>3,8 (n=1)   |
| Периферический                 | 58,8 (n=40)            |                        |
|                                | Мужчины<br>64,3 (n=25) | Женщины<br>35,7 (n=15) |
| Всего                          | 100,0 (n=68)           |                        |

Чаще всего опухоль располагалась в верхней доле легкого, что отмечено у 41 (60,3%) пациента НМРЛ (таблица 8). Поражение нижней доли установлено у 12 (30,9%) больных, и в 3 (4,4%) наблюдениях первичная опухоль локализовалась в средней доле. У 3 пациентов с центральным раком легкого не указан объем вовлечения в опухолевый процесс.

**Таблица 8** – Распределение больных НМРЛ в зависимости от локализации первичной опухоли.

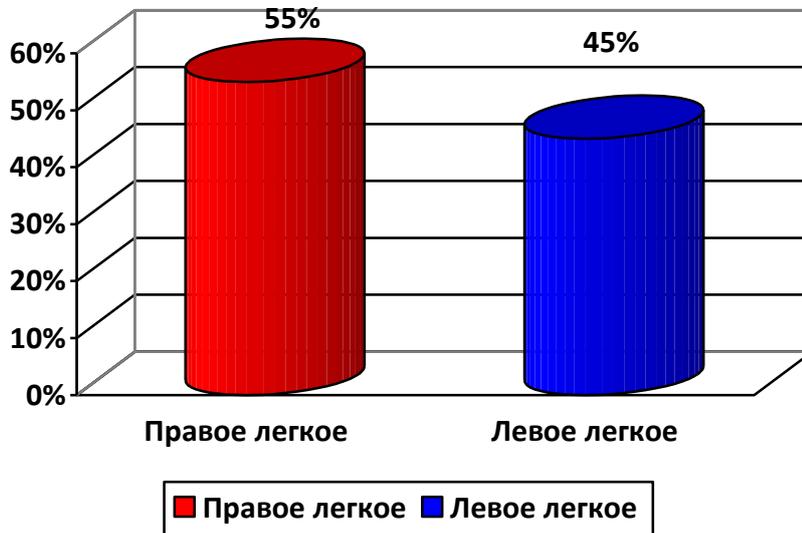
| <b>Локализация</b> | <b>Относительное количество больных (%)</b> | <b>Абсолютное количество больных</b> |
|--------------------|---|--------------------------------------|
| Верхняя доля       | 60,3  | 41                                   |
| Нижняя доля        | 30,9  | 21                                   |
| Средняя доля       | 4,4   | 3                                    |
| Не указана         | 4,4   | 3                                    |
| Всего              | 100,0                                       | 68                                   |

При центральной форме рака поражение верхней доли отмечено у 61,5% (n=16) больных, нижней – у 23,2% (n=6) (таблица 9). Только у 1 пациента первичный опухолевый очаг локализовался в средней доле. При периферическом НМРЛ локализация первичной опухоли в верхней доле наблюдалась у 59,5% (n=25), в нижней доле - у 35,7% (n=15), и в средней доле - у 2 больных.

**Таблица 9** – Распределение больных НМРЛ в зависимости от локализации первичной опухоли при разных клинко-анатомических формах

| <b>Доли легкого</b> | <b>Центральная форма</b>             |   | <b>Периферическая форма</b>          |   |
|---------------------|--------------------------------------|---|--------------------------------------|---|
|                     | <b>Абсолютное количество больных</b> | <b>Относительное количество больных (%)</b> | <b>Абсолютное количество больных</b> | <b>Относительное количество больных (%)</b> |
| Верхняя             | 16                                   | 61,5  | 25                                   | 59,5  |
| Нижняя              | 6                                    | 23,2  | 15                                   | 35,7  |
| Средняя             | 1                                    | 3,8   | 2                                    | 4,8   |
| не указано доли     | 3                                    | 11,5  | -                                    | -   |
| Итого               | 26                                   | 100,0                                       | 42                                   | 100,0                                       |

Локализация первичной опухоли в левом легком наблюдалась у 31 (45%) больного, в правом легком опухоль располагалась в 37 случаев (55%), что отображено на рисунке 5.



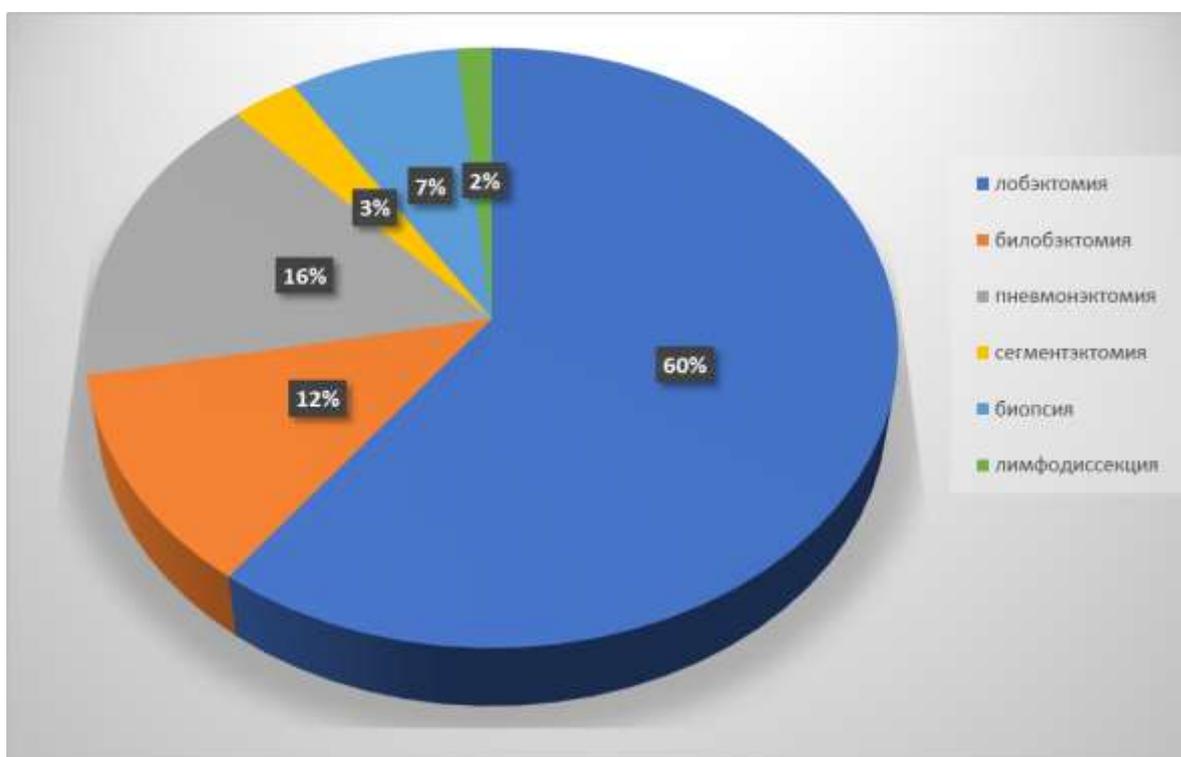
**Рисунок 5** – Распределение больных НМРЛ в зависимости от пораженного легкого

МРТ головного мозга выполнено в 69,1% (n=47) случаев. Из них только в одном установлено метастатическое поражение головного мозга.

При радиоизотопном сканировании костей скелета у 30,9 % (n=21) больных выявлены остеометаболические изменения. Метастатическое поражение костей (грудной позвонок) скелета диагностировано у одного больного. Всего 45 больных прошли данное обследование.

Больным НМРЛ в соответствии с распространенностью опухолевого процесса проведено хирургическое лечение, согласно общепринятым стандартам хирургического лечения больных немелкоклеточным раком легкого (анатомическая резекция легкого (лобэктомия, билобэктомия, пневмонэктомия). Систематическая ипсилатеральная медиастинальная лимфодиссекция являлась стандартным объемом у всей группы оперированных пациентов. Лобэктомия была выполнена у 60,3% (n=41) больных (рисунок 6). Хирургическое лечение в объеме билобэктомии получили 11,8% (n=8) пациентов, пневмонэктомии - 16,2%

больных. В 7,4% (n=5) случаев операция носила диагностический характер и ограничивалась биопсией (лимфатических узлов, плевры), а в 1 случае – паратрахеальной лимфодиссекцией.



**Рисунок 6** – Объемы оперативного вмешательства у больных НМРЛ

Ряду пациентов НМРЛ выполнены комбинированные оперативные вмешательства: пневмонэктомия с резекцией перикарда - 1, пневмонэктомия с резекцией левого предсердия - 1, билобэктомия с резекцией предсердия - 2 (из них в 1 случае в сочетании с краевой резекцией правого предсердия), лобэктомия с краевой резекцией правого предсердия - 1, лобэктомия с резекцией легочной артерии.

Данные о радикальности хирургического вмешательства представлены в таблице 10. Выполненная операция у подавляющего большинства больных носила характер (R0): опухолевые клетки по краю резекции отсутствовали. Радикальность вмешательства была подтверждена срочным (интраоперационным) и плановым морфологическим исследованием тканей по краю резекции. В двух случаях край резекции был гистологически позитивный (R1).

**Таблица 10** – Виды и радикальность хирургического вмешательства у больных НМРЛ

| <b>Объем операции</b> | <b>Радикальность</b> | <b>Относительное количество больных (%)</b> | <b>Абсолютное количество больных</b> |
|-----------------------|----------------------|---|--------------------------------------|
| лобэктомия            | R0 (n=39), R1 (n=2)  | 66,2  | 41                                   |
| билобэктомия          | R0                   | 12,9  | 8                                    |
| пневмонэктомия        | R0                   | 17,7  | 11                                   |
| сегментэктомия        | R0                   | 3,2   | 2                                    |
| Всего                 |                      | 100   | 62                                   |

Распределение больных по стадиям опухолевого процесса в соответствии с международной классификацией TNM (7 пересмотра) представлено в таблице 11. Следует отметить, что в исследовании преобладали больные со стадиями IB (22,0%), ПА (19,1%), ША (20,6%). IA стадия установлена у 8 (11,8%) больных, ПВ в аналогичном проценте наблюдений, ПШВ стадия диагностирована у 4 (5,9%) больных.

**Таблица 11** – Распределение больных НМРЛ по стадиям опухолевого процесса

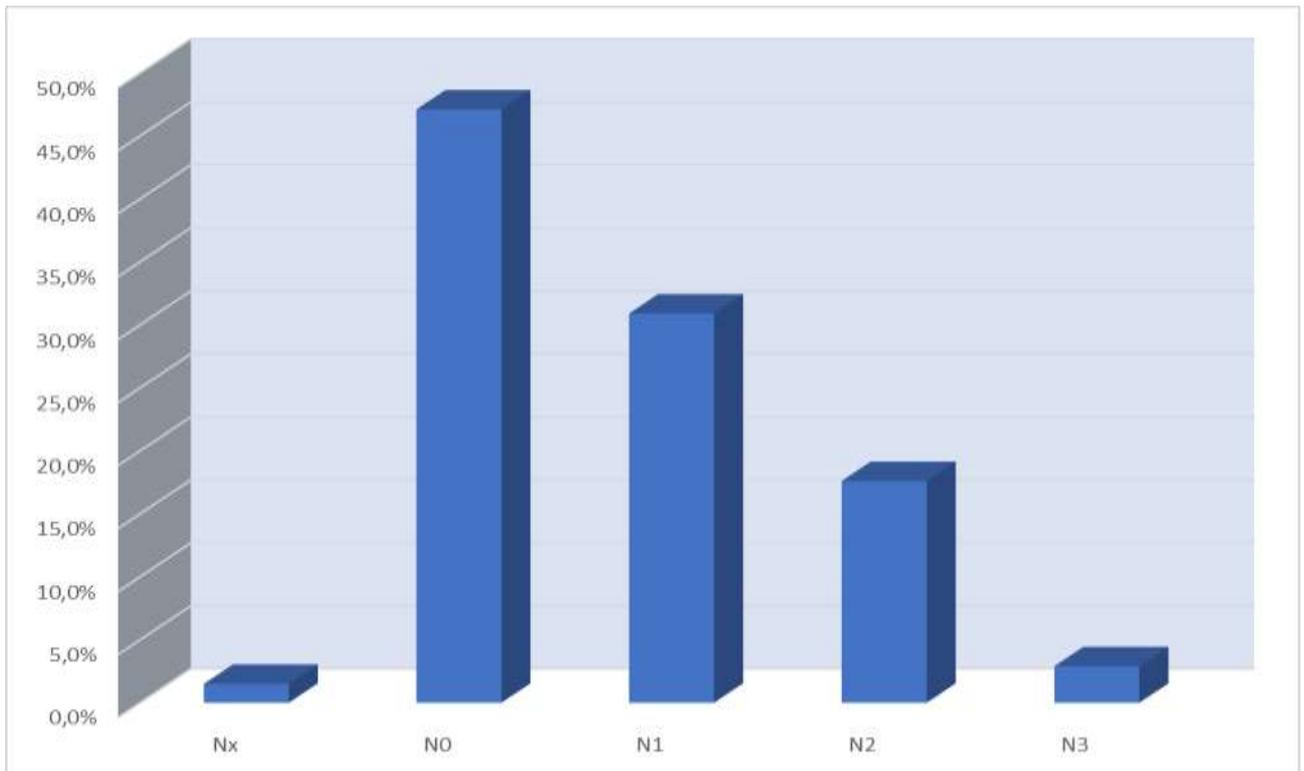
| <b>Стадия заболевания</b> | <b>Относительное количество больных (%)</b> | <b>Абсолютное количество больных</b> |
|---------------------------|---|--------------------------------------|
| IA                        | 11,8  | 8                                    |
| IB                        | 22,0  | 15                                   |
| ПА                        | 19,1  | 13                                   |
| ПВ                        | 11,8  | 8                                    |
| ША                        | 20,6  | 14                                   |
| ПШВ                       | 5,9   | 4                                    |
| IV                        | 8,8   | 6                                    |
| Всего                     | 100,0                                       | 68                                   |

В соответствии с размером первичной опухоли больные распределились следующим образом (таблица 12). Как видно из таблицы стадия T1a установлена у 5,9% (n=4) больных, T1b выявлена у 10,3% (n=7) больных. В 45,6% (n=31) случаев, размер первичной опухоли соответствовал стадии T2a, а в 10,3% (n=7) случаях - стадии T2b. У остальных больных были установлены стадии T3 и T4: 17,6% (n=12) и 10,3% (n=7) соответственно.

**Таблица 12** – Распределение больных НМРЛ в зависимости от символа T

| <b>Стадия заболевания</b> | <b>Относительное количество больных (%)</b> | <b>Абсолютное количество больных</b> |
|---------------------------|---|--------------------------------------|
| T1a                       | 5,9   | 4                                    |
| T1b                       | 10,3  | 7                                    |
| T2a                       | 45,6  | 31                                   |
| T2b                       | 10,3  | 7                                    |
| T3                        | 17,6  | 12                                   |
| T4                        | 10,3  | 7                                    |
| Всего                     | 100,0                                       | 68                                   |

Метастатическое поражение лимфатических узлов наблюдалось у 35 больных. Данные представлены на рисунке 7. Из них поражение ипсилатеральных перибронхиальных и/или пульмональных лимфатических узлов корня лёгкого (включая их вовлечение путём непосредственного распространения самой опухоли) (N1) было установлено у 30,9% (n=21) больного. В 17,6% (n=12) случаях отмечено метастатическое поражение ипсилатеральных медиастинальных лимфатических узлов (N2). У 2,9% (n=2) больных установлена стадия N3. В 47,1% (n=32) случаях лимфатические узлы по данным гистологического исследования были интактны (N0). В 1 случае индекс N не был установлен (Nx) – 1,5%.



**Рисунок 7** – Распределение больных НМРЛ в зависимости от статуса лимфатических узлов

Отдаленные метастазы (M1) выявлены у 6 больных (8,8%). Из них у 2 больных имелись метастазы опухоли по плевре. Метастаз в контрлатеральное легкое выявлен также у 2 пациентов. В одном случае отмечено метастатическое поражение головного мозга и грудного позвонка, и в одном случае - метастаз в надпочечник.

**Таблица 13** – Распределение больных НМРЛ в зависимости от символа M.

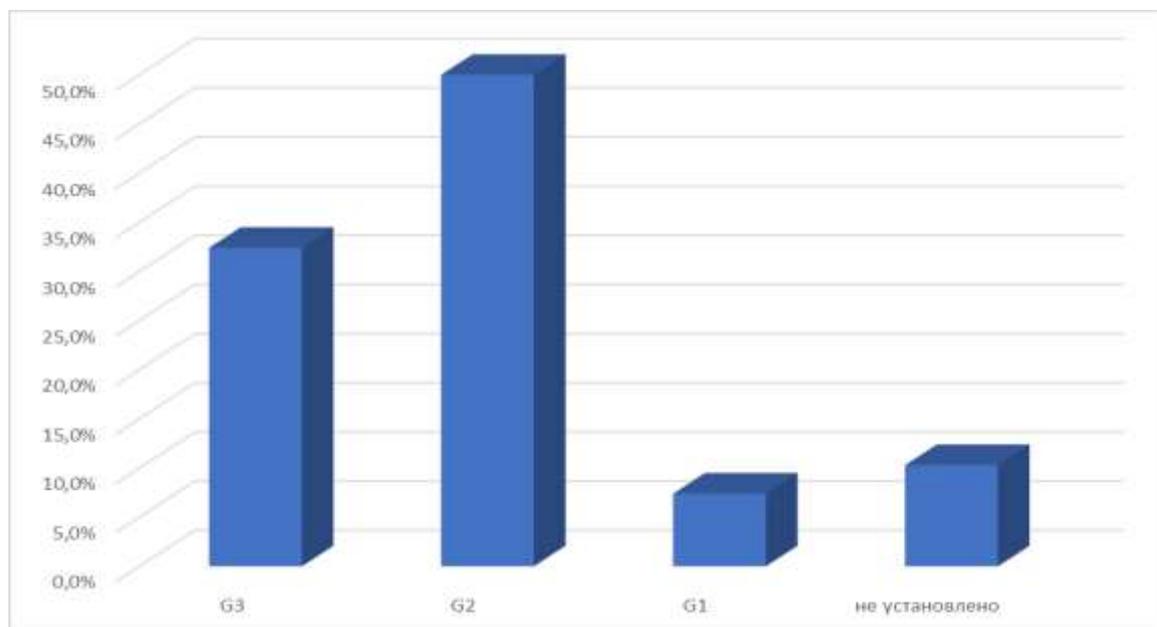
| Стадия заболевания | Относительное количество больных, % | Абсолютное количество больных |
|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| M1a                | 33,4                                | 2                             |
| M1b                | 66,6                                | 4                             |
| Всего              | 100,0                               | 6                             |

В зависимости от гистологического подтипа больные НМРЛ распределились следующим образом. В 38 (55,8%) случаях установлена АК легкого, в 28 (41,2%) случаях выявлен ПКР легкого и в 2 (3%) наблюдениях опухоль имела смешанный характер строения (таблица 14).

**Таблица 14** – Распределение больных НМРЛ в зависимости от гистологического типа

| Гистологический вид | Абсолютное количество больных | Относительное количество больных (%) |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| Плоскоклеточный     | 28                            | 41,2                                 |
| Аденокарцинома      | 38                            | 55,8                                 |
| другие виды         | 2                             | 3,0                                  |
| Всего               | 68                            | 100,0                                |

Дифференцировка (G) опухоли, установленная по результатам патоморфологического исследования, представлена на рисунке 8. Следует отметить, что в исследовании преобладали больные с умеренно-дифференцированными опухолями (G2) (50%, n=34). Высокодифференцированная форма (G1) НМРЛ наблюдалась у 7,4% (n=5) больных, в то время как низкая степень дифференцировки (G3) отмечена в 32,4% (n=22) случаев. В 7 случаях дифференцировка опухоли не определялась.



**Рисунок 8** – Распределение больных в зависимости от степени дифференцировки (G) опухоли

## 2.2. Методы исследования

Морфологическое исследование операционного материала больных НМРЛ проводилось в отделении патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии им.Н.Н. Блохина» Минздрава России и включало в себя определения гистотипа рака легкого, наличия сосудистой инвазии и метастатического поражения удаленных лимфоузлов, исследование края резекции опухоли, степень дифференцировки опухоли. После фиксации операционного материала формалином по стандартной методике его заключали в парафиновые блоки. При помощи микротомы подготавливались срезы и помещали на предметное стекло. Окрашивание препарата производили гематоксилином и эозином. По результатам микроскопии препарата морфологом устанавливался диагноз в соответствии с классификацией рака легкого (7 пересмотра).

Морфологическое и иммунологическое исследование костного мозга проводилось в лаборатории иммунологии гемопоэза клинико-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им.Н.Н. Блохина» Минздрава России (заведующий Н.Н. Тупицын). Для данного исследования всем больным под медикаментозной седацией выполнялась стерильная пункция. Забор костного мозга осуществлялся в объеме 0,25-0,5 мл, поскольку при большем объеме, возрастала вероятность контаминации образца периферической кровью.

Морфологическое исследование (миелограмма) выполнялось на 6 стеклах, окрашенных по методу Романовского. Подсчет миелограммы и поиск опухолевых клеток осуществлялись параллельно двумя независимыми экспертами - морфологами.

Иммунологическое исследование проводилось методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, напрямую меченных различным флюорохромами. Используемые в работе моноклональные антитела представлены в таблице 15.

**Таблица 15** – Моноклональные антитела

| №  | Антитело | Флуоресцентная метка | Производитель         |
|----|----------|----------------------|-----------------------|
| 1  | CD45     | V450, PerCP          | Becton Diskinson, США |
| 2  | ЕpCAM    | FITC, PE,            | Becton Diskinson, США |
| 3  | KL-1     | FITC,                | «Immunotech», Франция |
| 4  | CD2      | V450                 | Becton Diskinson, США |
| 5  | CD3      | APC                  | Becton Diskinson, США |
| 6  | CD4      | V450                 | Becton Diskinson, США |
| 7  | CD8      | APC -H7              | Becton Diskinso, США  |
| 8  | CD25     | APC                  | Becton Diskinson, США |
| 9  | CD19     | FITC, PE             | Becton Diskinson, США |
| 10 | CD20     | APC -H7              | Becton Diskinson, США |
| 11 | CD16     | FITC                 | Becton Diskinson, США |
| 12 | CD16     | FITC                 | Becton Diskinson, США |
| 13 | CD27     | PerCP                | Becton Diskinson, США |
| 14 | Perforin | PE                   | Becton Diskinson, США |

В работе определялись ДОК: CD45-ЕpCAM+(KL-1+). Популяции костномозговых Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток изучены на основании экспрессии следующих антигенов: CD3, CD2, CD4, CD8, CD19, CD20, CD16, CD27, CD25 (Таблица 16).

**Таблица 16** – Характеристика изученных антигенов

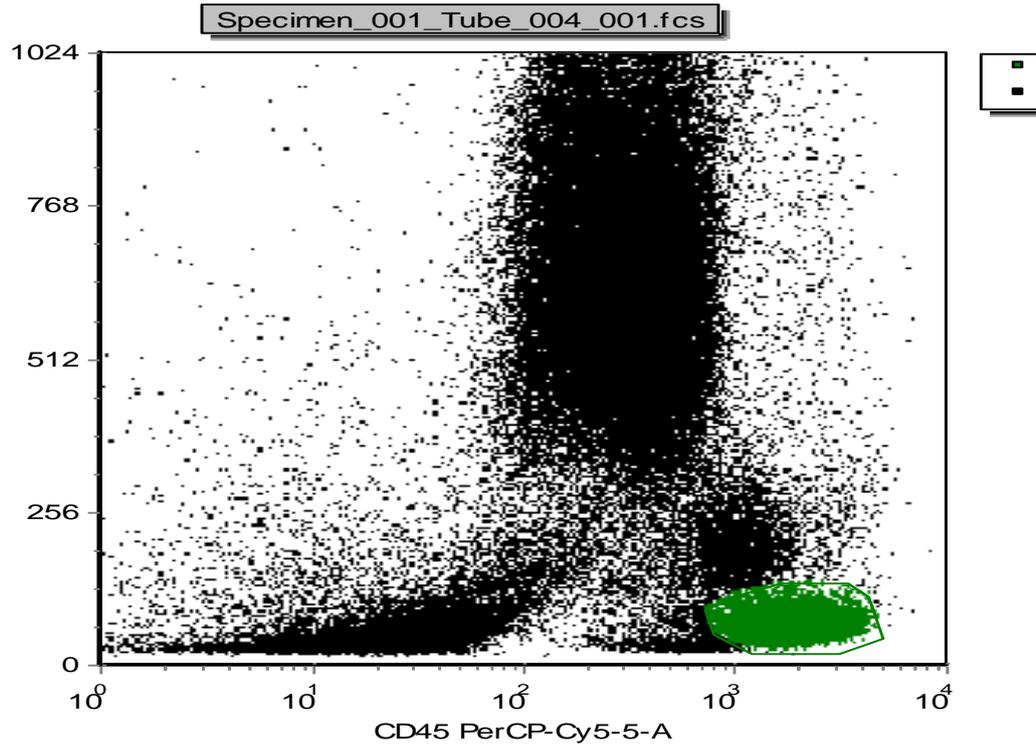
| Антиген | Лиганд | Клетки, несущие антиген  | Функции антигена  |
|---------|--------|--|---|
| CD45    | -      | Все лейкоциты  | Участвует в активации лимфоцитов, внутриклеточная часть рецептора является тирозинкиназой |
| CD27    |        | Медулярные тимоциты, зрелые Т-клетки, В-клетки памяти, НК-клетки | Регуляция В-клеточной пролиферации, активации и дифференцировки Т-клеток                  |

|                               |                 |   |  |
|-------------------------------|-----------------|---|--|
| Perforin                      |                 | Зрелые Т-клетки,<br>NK-клетки           | Участвует в цитолизе клеток-мишеней  |
| CD2                           | LFA-3           | Т- и NK-лимфоциты                       | Участвует в активации Т-лимфоцитов   |
| CD3                           | -               | Т-лимфоциты                             | Связан с антигенраспознающим рецептором Т-лимфоцитов, участвует в их активации                     |
| CD4                           | HLA класса II   | Т-лимфоциты,<br>моноциты                | Присутствует на Т-хелперах, обеспечивает их взаимодействие с макрофагами                           |
| CD8                           | HLA класса I    | Т- и NK-лимфоциты                       | Присутствует на цитотоксических, Т-лимфоцитах, обеспечивает их взаимодействие с клетками-мишенями  |
| CD25                          | Интерлейкин-2   | Т-, В- и NK-лимфоциты,<br>моноциты      | Альфа-цепь рецептора к интерлейкину-2 (p55), маркер активированных Т- и В-лимфоцитов               |
| Поверхностные иммуноглобулины | Антиген         | В-лимфоциты                             | Присутствуют только на зрелых В-лимфоцитах   |
| CD19                          | -               | В-лимфоциты                             | Присутствует на пре-В-лимфоцитах и на всех зрелых В-лимфоцитах, участвует в активации В-лимфоцитов |
| CD20                          | -               | В-лимфоциты                             | Присутствует на всех В-лимфоцитах  |
| CD 16                         | Fc-рецептор IgG | NK-лимфоциты,<br>моноциты и гранулоциты | Низкоаффинный рецептор IgG   |
| CD56                          | -               | NK- и Т-лимфоциты                       | Участвует в межклеточной адгезии   |

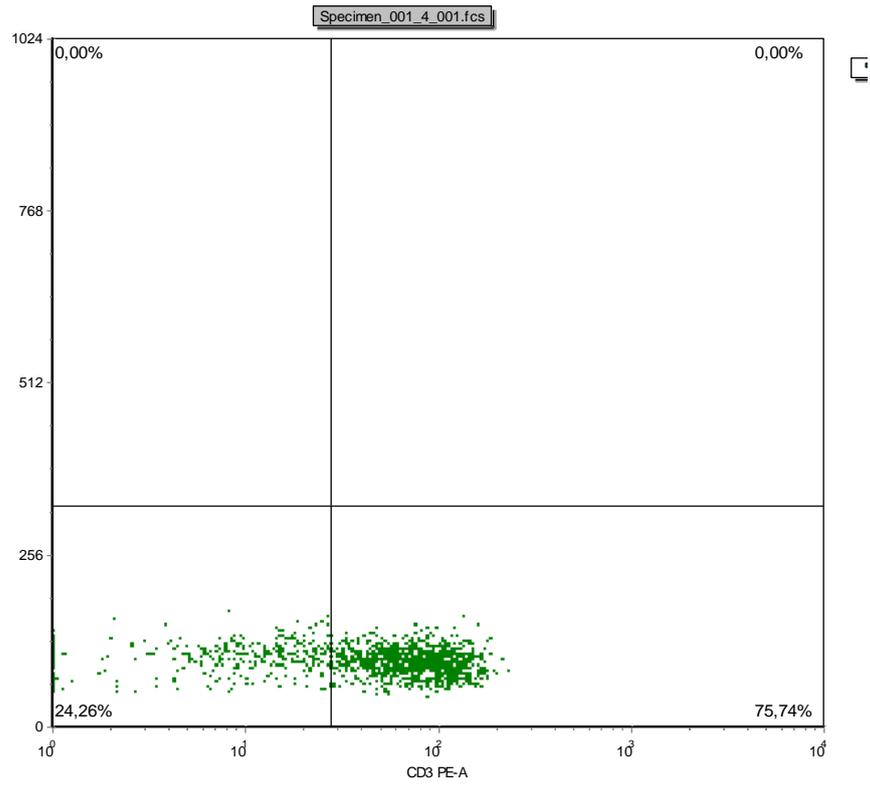
Объем образца КМ в пробирке доводили до 10 мл буферным раствором PBS Cell Wash (BD), тщательно перемешивали, центрифугировали (5 мин), надосадочную жидкость сливали. После этого клетки ресуспензировали (vortex 10 сек.), добавляли 2 мл лизирующего раствора FACS Lysing Solution (BD) и инкубировали при комнатной температуре 5 минут. Добавляли буферный раствор PBS и проводили отмывку. Процедуру при необходимости повторяли. После этого суспензию клеток раскапывали в пробирки. В пробирки, в которых требовалось проведение пермеабиллизации, вносили пермеабиллизирующий раствор в объеме 800 мкл. и инкубировали в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре. Затем центрифугировали (5 мин) и удаляли надосадочную жидкость. Проводили процедуру отмывки клеточной суспензии с помощью раствора PBS. Следующим этапом проводили инкубацию клеток КМ с моноклональными антителами в течении 20 минут при комнатной температуре. Затем клеточную суспензию отмывали дважды раствором PBS. Сбор клеток проводили на 8-ми цветном проточном цитометре FACSCanto II (США). Оценка экспрессии антигенов выполнялась с помощью программы Kaluza Analysis v2.1 (Beckman Coulter, USA)

ДОК выявлялись по отсутствию экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в сочетании с экспрессией EPCAM или KL-1. Анализировались 20 млн миелокариоцитов (или все клетки образца), при этом положительными считались случаи при обнаружении не менее 1 клетки на 10 млн миелокариоцитов.

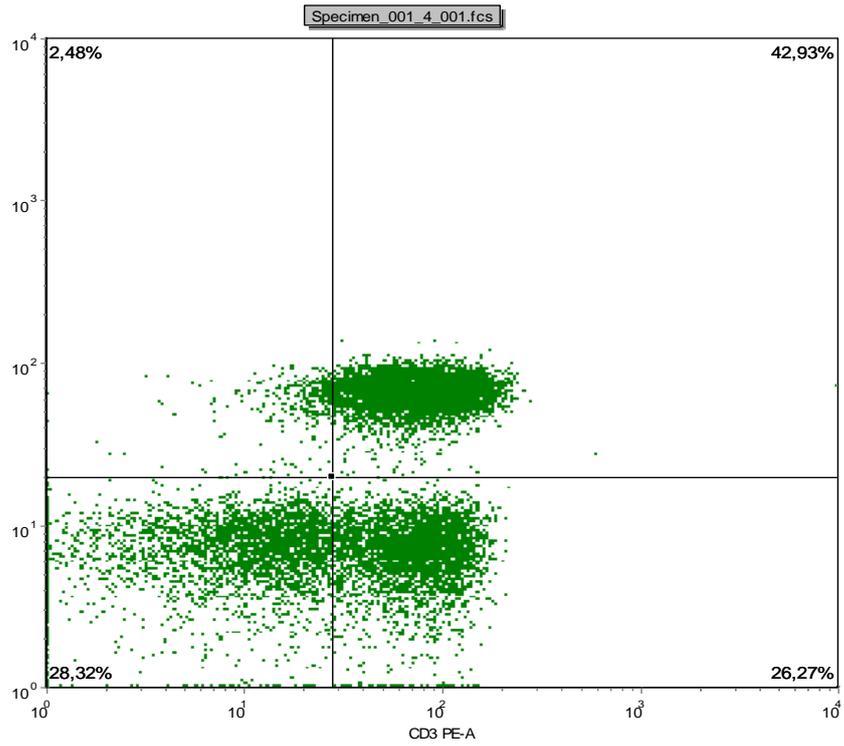
Субпопуляционный состав КМ изучался в гейте зрелых лимфоцитов, на основании выраженной экспрессии CD45 в сочетании с низкими характеристиками бокового светорассеяния (SSC). Сбор осуществлялся на 100 тыс. клеток. На рисунке 9, приведен пример выделения фракции лимфоцитов в характеристиках SSC и последующей оценки субпопуляции CD3+ Т-клеток.



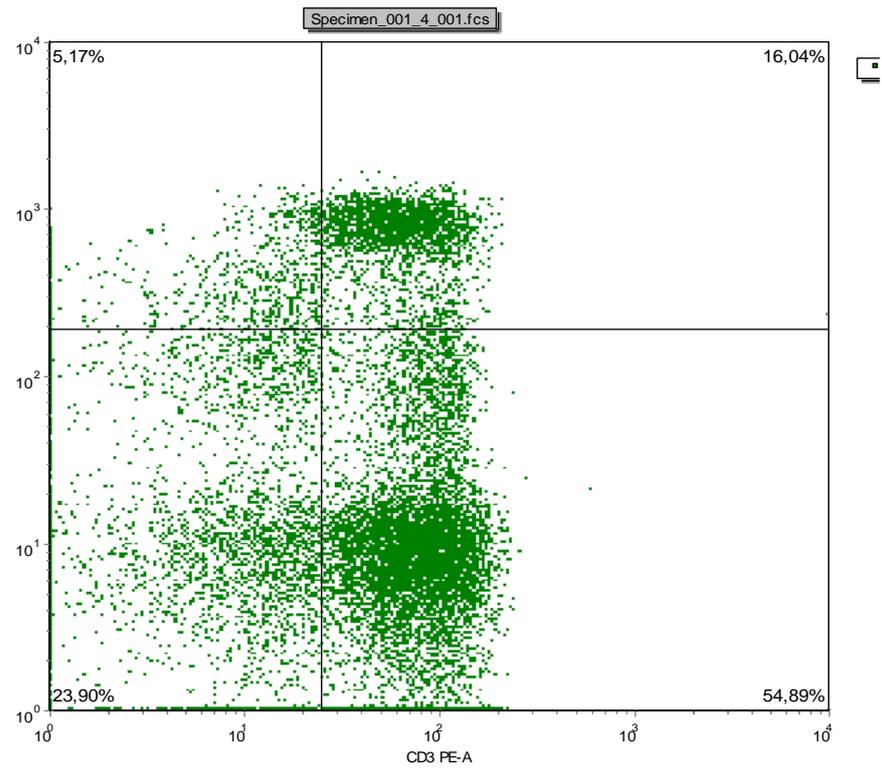
A



Б



B



Г

**Рисунок 9** –. Пример цитометрической оценки субпопуляции CD3+ Т-клеток в КМ больного НМРЛ

На рисунке представлен цитометрический анализ субпопуляций Т-клеток в образце КМ одного пациента. Клетки окрашивались одномоментно 4 моноклональными антителами, меченными различными флюорохромами. Анализ субпопуляции Т-клеток проводился в пределах изолированного гейта CD45+ клеток.

*А* – общее количество CD45+ клеток в образце КМ. По оси абсцисс – экспрессия пан-лейкоцитарного антигена CD45+; по оси ординат – параметр бокового светорассеяния лазерного луча, отражающий рабочее цитометрическое понятие – гранулярность клетки. Далее проводилась оценка экспрессии Т-клеточных антигенов в пределах гейта CD45+;

*Б* – клетки, попавшие только в область CD3+, т. е. Т-клетки, накопившиеся в ходе сбора образца;

*В* – количество, экспрессирующих маркеры CD3+CD4+ Т-клеток составляет 42,9%;

*Г* – присутствие в образце CD8+ Т-клеток; субпопуляция CD3+CD8+ Т-клеток составляет 16,04 %.

### **2.3. Статистическая обработка результатов исследования**

Для проведения статистического анализа полученных результатов работы был разработан специальный кодификатор. Все данные, касающиеся 68 больных НМРЛ были внесены в таблицы и обработаны при помощи программы SPSS, v. 21.

Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию *t* Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для установления связи между двумя дискретными величинами, в зависимости от их типа и получаемых таблиц сопряженности использовали точный критерий Фишера и  $\chi^2$  по Пирсону, различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ проводили по Пирсону или Спирмену.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

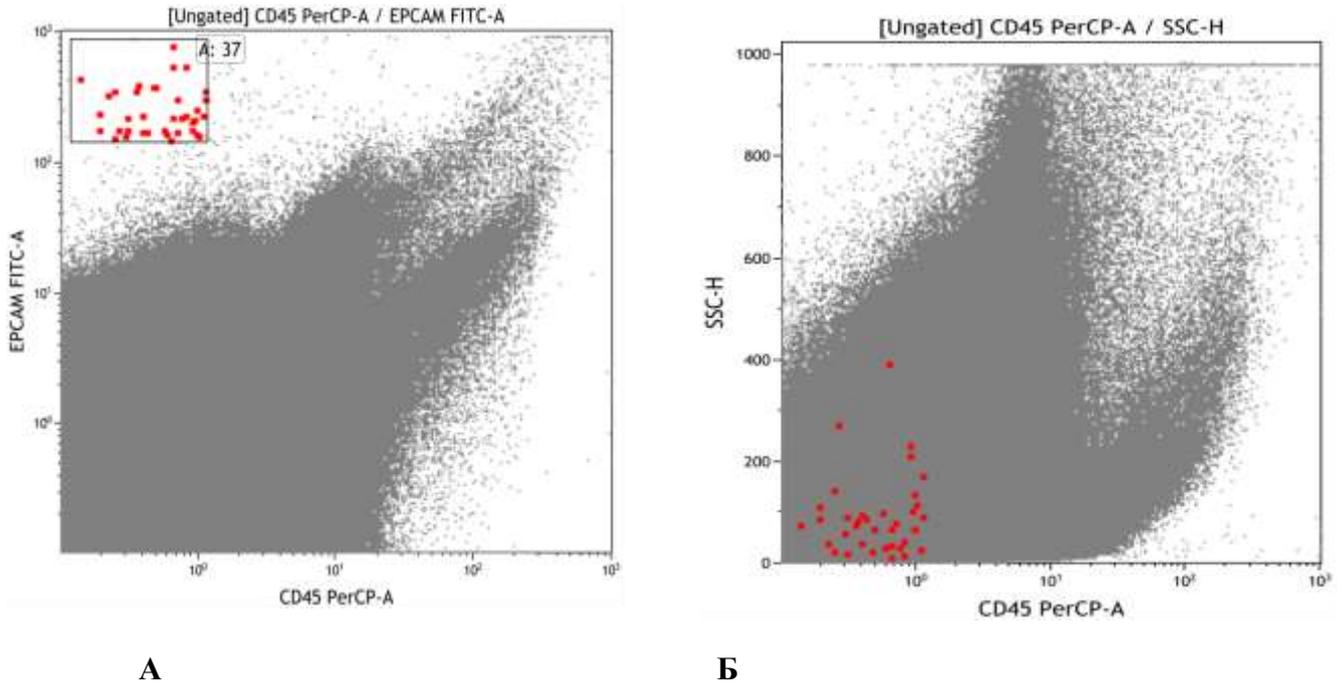
#### 3.1. Диссеминированные опухолевые клетки в костном мозге у больных НМРЛ и их взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками опухоли

Изучение ДОК в КМ больных НМРЛ выполнялось в несколько этапов. Первым этапом в работе проводилось морфологическое изучение КМ: подсчет миелограммы и поиск опухолевых клеток. Морфологически ДОК в КМ выявлены только в 1 из 62 случаев. Следующим этапом выполняли иммунологическую оценку методом проточной цитометрии. Для установления наличия ДОК в КМ нами был задан пороговый уровень значений: 1 опухолевая клетка на 10 млн. миелокариоцитов. С учетом заданного порогового значения на основании яркой экспрессии EPCAM и отсутствия экспрессии CD45 в КМ больных НМРЛ выявлены ДОК (CD45-EPCAM+) в 43,5 % случаев (n=27). Данные представлены на рисунке 10.



**Рисунок 10** – Частота выявления ДОК в КМ больных НМРЛ (методом проточной цитометрии)

Пример выявления ДОК в КМ больного НМРЛ методом проточной цитометрии представлен на рисунке 11.



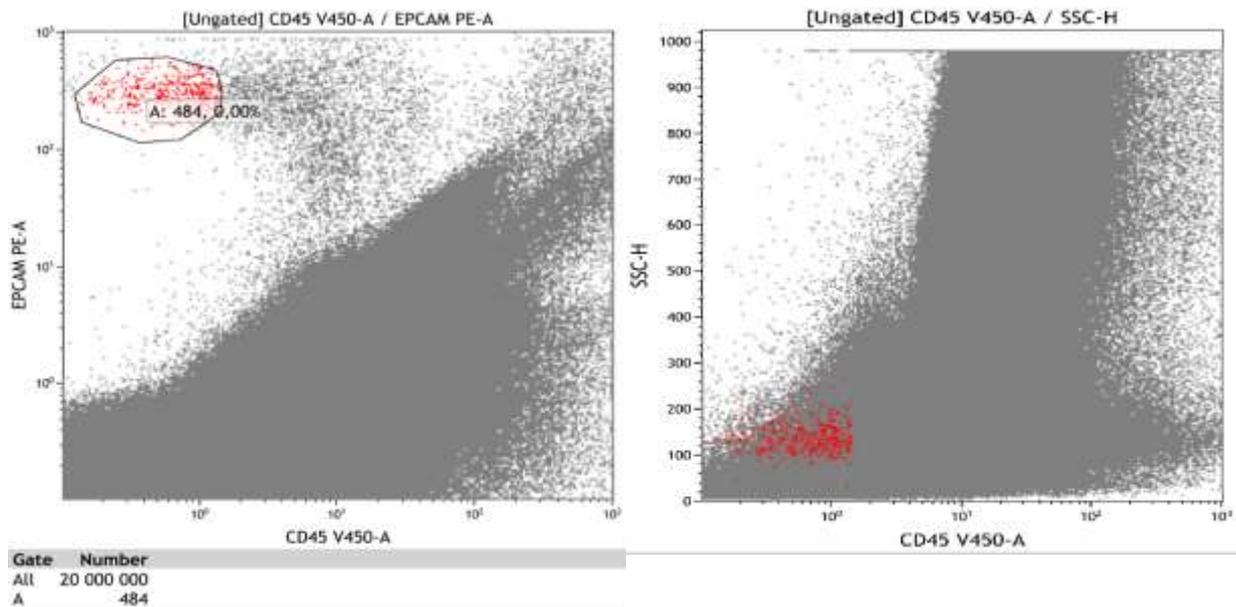
**Рисунок 11.** – Выявление диссеминированных опухолевых клеток в КМ больного НМРЛ методом проточной цитометрии. На цитограмме (А) в гейте А, ДОК (37 клеток) наблюдались на основании экспрессии EPCAM (ось Y) и отсутствия CD45 (ось X). На цитограмме (Б) показано отсутствие экспрессии CD45 (ось X) и низкие характеристики бокового светорассеяния SSC (ось Y) ДОК

Одна эпителиальная (опухолевая) клетка среди 10 млн. миелокариоцитов в образцах КМ выявлена у 9 (14,5%) больных. В остальных случаях количество опухолевых клеток, определяемых иммуноцитологически, варьировало от 2 до 242. У 2 (3,2%) из 62 больных НМРЛ обнаружено скопление опухолевых клеток. Морфологически ДОК в КМ у данных больных не обнаружены.

Сразу отметим, что по результатам проведенного анализа, количество выявленных опухолевых клеток в КМ больных НМРЛ не зависело от стадии. Например, малое количество клеток (не более 5) обнаружено как при наличии метастазов в отдаленные органы (M1), так и на более ранних стадиях. В целом число ДОК в образцах КМ было низким: у большинства больных НМРЛ не

превышало 5 клеток на 10 млн. Максимальное количество ДОК (242 клетки) в КМ наблюдалось у больного со ПА стадией (T2aN1M0) ПКР легкого.

На рисунке 12, представлена цитограмма данного образца КМ. Как видно из рисунка, на 20 млн. миелокарицитов выявлены 484 опухолевые клетки, которые характеризуются яркой экспрессией EPCAM и отсутствием экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45. Следует отметить, что при этом поражения КМ морфологическим методом у данного больного не установлено. При изучении миелограммы больного Ж., обнаружено, что клеточность КМ у данного больного была повышенная (229 тыс/мкл). Также обращали на себя внимание изменения показателей гранулоцитарного ростка: сниженное количество метамиелоцитов (6,4% при норме 8–15%), сниженный индекс созревания нейтрофилов (0,4 при норме 0,5–0,9). Кроме того, отмечены изменения в эритроидном ростке: наблюдалось повышение оксифильных форм нормобластов (7,6% при норме 0,8–5,6%).

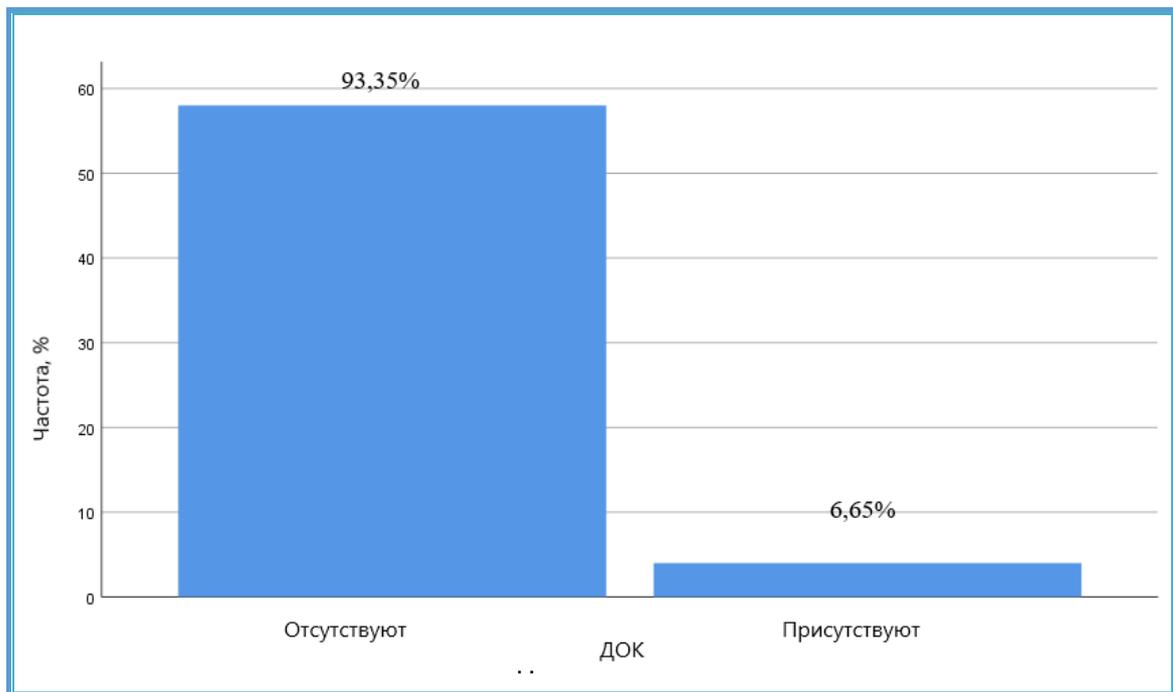


**А**

**Б**

**Рисунок 12** – Диссеминированные опухолевые клетки в КМ больного Ж. На цитограмме (А) в гейте А, ДОК (484 клетки) наблюдались на основании яркой экспрессии EPCAM (ось Y) и отсутствия CD45 (ось X) на цитограмме Б с низкими характеристиками бокового светорассеяния.

На следующем этапе нами проведена оценка поражения КМ при разных пороговых значениях: 1 клетка на 1 млн. миелокариоцитов, 1 клетка на 100 тыс. миелокариоцитов. При использовании порогового уровня 1 клетка на 1 млн миелокариоцитов ДОК были обнаружены в 4 (6,65%) образцах КМ больных НМРЛ, что отображено на рисунке 13. При этом в 2 случаях наблюдалась II стадия НМРЛ. Оценка образцов КМ с использованием порогового уровня 1 клетка на 100 тыс миелокариоцитов позволила выявить ДОК в КМ только в 1 случае: у больного со II стадией (T2aN1M0).



**Рисунок 13** – Частота выявления ДОК в КМ больных НМРЛ на 1 млн. миелокариоцитов

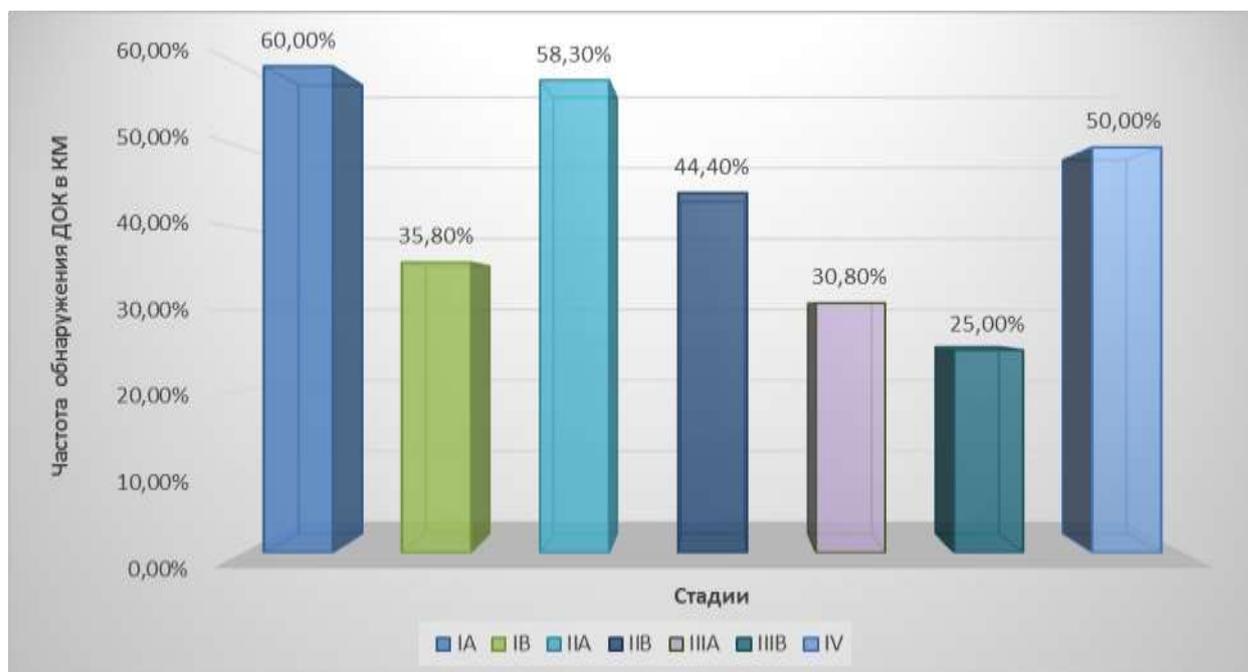
Далее нами были исследованы взаимосвязи таких признаков, как возраст пациента, пол, стадия заболевания, размеры первичной опухоли (Т), статус регионарных лимфатических узлов (N), степень дифференцировки опухоли (G) с наличием ДОК в КМ больных НМРЛ.

Проведенный анализ взаимоотношений между поражением КМ (при заданном пороговом значении 1 клетка/10 млн. миелокариоцитов) и полом достоверной связи не выявил. Данные представлены в таблице 17. Взаимосвязи между поражением КМ и возрастом также не наблюдалось.

**Таблица 17** – Связь поражения КМ с полом больных НМРЛ

| Пол     |         | ДОК в КМ    |              | Итого  |
|---------|---------|-------------|--------------|--------|
|         |         | Отсутствуют | Присутствуют |        |
| Мужской | Частота | 27          | 21           | 48     |
|         | Процент | 56,2%       | 43,8%        | 100,0% |
| Женский | Частота | 8           | 6            | 14     |
|         | Процент | 57,1%       | 42,9%        | 100,0% |
| Итого   | Частота | 35          | 27           | 62     |
|         | Процент | 56,5%       | 43,5%        | 100,0% |
| p=0,953 |         |             |              |        |

Следующим этапом работы было проведение анализа взаимосвязи поражения КМ больных НМРЛ с клинико-морфологическими характеристиками первичной опухоли. Нами изучена частота обнаружения ДОК в КМ в зависимости от стадии опухолевого процесса. Распределение ДОК позитивных и ДОК негативных случаев по стадиям представлены на рисунке 14. Как видно из рисунка ДОК в КМ выявлялись на всех стадиях НМРЛ. Обращает на себя внимание, что опухолевые клетки среди миелокариоцитов присутствуют даже на начальных стадиях развития опухоли. Данный факт свидетельствует о раннем процессе гематогенного микрометастазирования.

**Рисунок 14** – Распределение частоты поражения КМ в зависимости от стадии НМРЛ

Частота обнаружения ДОК при IA и IIА стадиях была наибольшая и составила 60,0% (n=3) и 58,3% (n=7) соответственно (таблица 18). В целом, при I стадии поражение КМ наблюдалось у 8 из 18 больных. При II стадии установлено, что ДОК присутствовали в образцах КМ 11 из 21 больных. При III стадии 5 случаев из 17 были ДОК позитивными. Интересно, что при IIIВ стадии частота выявления ДОК была минимальной и составила 25,0% (1 из 4 больных).

**Таблица 18** – Частота поражения КМ больных НМРЛ в зависимости от стадии опухолевого процесса

| Стадии  |         | ДОК         |              | Итого  |
|---------|---------|-------------|--------------|--------|
|         |         | отсутствуют | присутствуют |        |
| I A     | Частота | 2           | 3            | 5      |
|         | Процент | 40,0%       | 60,0%        | 100,0% |
| I B     | Частота | 8           | 5            | 13     |
|         | Процент | 61,5%       | 38,5%        | 100,0% |
| II A    | Частота | 5           | 7            | 12     |
|         | Процент | 41,7%       | 58,3%        | 100,0% |
| II B    | Частота | 5           | 4            | 9      |
|         | Процент | 55,6%       | 44,4%        | 100,0% |
| III A   | Частота | 9           | 4            | 13     |
|         | Процент | 69,2%       | 30,8%        | 100,0% |
| III B   | Частота | 3           | 1            | 4      |
|         | Процент | 75,0%       | 25,0%        | 100,0% |
| IV      | Частота | 3           | 3            | 6      |
|         | Процент | 50,0%       | 50,0%        | 100,0% |
| Итого   | Частота | 35          | 27           | 62     |
|         | Процент | 56,5%       | 43,5%        | 100,0% |
| p=0,475 |         |             |              |        |

Далее нами проанализирована связь между размером (символ T) первичной опухоли и наличием ДОК в КМ (Таблица 19). Как видно из представленных

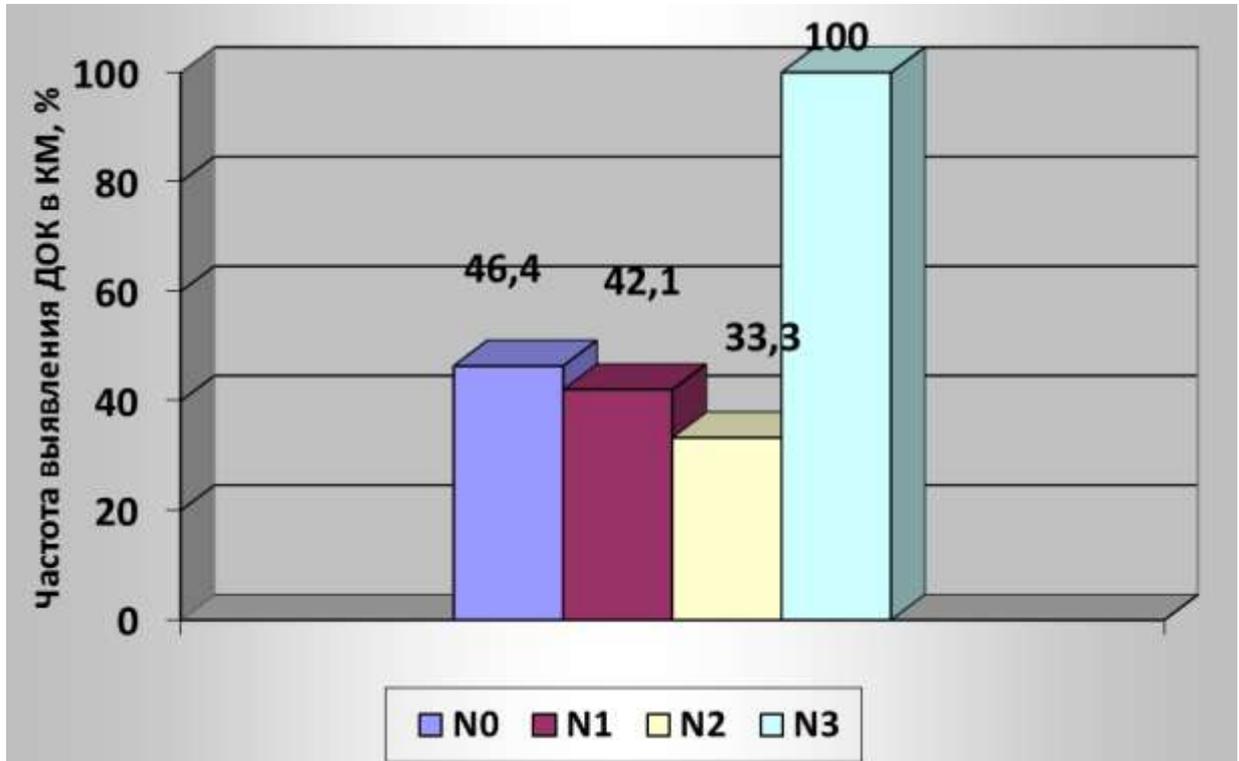
данных, большинство ДОК позитивных случаев (71,4%, 5 из 7) наблюдались при T1 стадии НМРЛ. При T2 стадии ДОК в КМ выявлены у 43,2% больных НМРЛ. При размерах первичной опухоли, соответствующих стадии T3 и T4 ДОК выявлялись реже: 36,4 и 28,6% соответственно. Различия носили не достоверный характер,  $p=0,130$ . В исследованиях германских (Pantel К. и соавт.) и японских (Yasumoto К. и соавт.) ученых напротив установлена положительная корреляция между размером опухоли и наличием опухолевых клеток в КМ: при большем размере опухоли (T3-4) ДОК в КМ выявлялись достоверно чаще [133, 184].

**Таблица 19** – Частота выявления ДОК в зависимости от символа T

| Размер опухоли<br>(символ T) |                    | ДОК         |              | Всего  |
|------------------------------|--------------------|-------------|--------------|--------|
|                              |                    | отсутствуют | присутствуют |        |
| T1                           | Количество больных | 2           | 5            | 7      |
|                              | Процент            | 28,6%       | 71,4%        | 100,0% |
| T2                           | Количество больных | 21          | 16           | 37     |
|                              | Процент            | 56,8%       | 43,2%        | 100,0% |
| T3                           | Количество больных | 7           | 4            | 11     |
|                              | Процент            | 63,6%       | 36,4%        | 100,0% |
| T4                           | Количество больных | 5           | 2            | 7      |
|                              | Процент            | 71,4%       | 28,6%        | 100,0% |
| Всего                        | Количество больных | 35          | 27           | 62     |
|                              | Процент            | 56,5%       | 43,5%        | 100,0% |

Известный факт, что вовлечение регионарных лимфатических узлов является важным прогностическим фактором течения опухоли, подвиг нас проанализировать существует ли взаимосвязь между наличием в КМ ДОК и метастатически измененными лимфоузлами. Выполненное сравнение статуса лимфатических узлов и ДОК статуса в нашем исследовании статистически значимых отличий не выявило. Данные представлены на рисунке 15. Интересно отметить, что отсутствие метастазов в регионарных лимфоузлах не означало отсутствие ДОК в КМ больного. В случаях, когда лимфатические узлы были

интактны, поражение КМ установлено в 46,4% (13 из 28) случаев. При стадии N1 ДОК выявлялись у 42,1% (8 из 19) больных, а при N2 и N3 в 33,3% (4 из 12) и 100% случаев соответственно. Следует обратить внимание, что в исследовании преобладали больные с поражением лимфоузлов (53%).



**Рисунок 15** – Частота выявления ДОК в КМ больных НМРЛ в зависимости от статуса лимфоузлов

Проведенный анализ взаимосвязи наличия отдаленных метастазов (M1) с ДОК статусом, установил следующее: у 50% (3 из 6) больных с отдаленными метастазами установлено присутствие в КМ ДОК. Следует отметить, что у данных больных количество выявленных опухолевых клеток составило в среднем 5 на 10 млн. миелокариоцитов.

Следующим этапом мы оценили, насколько взаимосвязан гистологический тип опухоли с поражением КМ больных НМРЛ. Полученные данные представлены в таблице 20. Оценка наличия ДОК в КМ в зависимости от гистологического вида опухоли обнаружила, что поражение КМ чаще наблюдалось при АК (45,5%, n=15 против 37,0%, n=10), чем при ПКР. Различия не достоверны: p=0,501.

**Таблица 20** – Частота поражения КМ в зависимости от гистологического типа НМРЛ

| Гистологический вид НМРЛ |         | ДОК         |              | Итого  |
|--------------------------|---------|-------------|--------------|--------|
|                          |         | отсутствуют | присутствуют |        |
| Плоскоклеточный          | Частота | 17          | 10           | 27     |
|                          | Процент | 63,0%       | 37,0%        | 100,0% |
| Аденокарцинома           | Частота | 18          | 15           | 33     |
|                          | Процент | 54,5%       | 45,5%        | 100,0% |
| Итого                    | Частота | 35          | 25           | 60     |
|                          | Процент | 58,3%       | 41,7%        | 100,0% |
| p= 0,501                 |         |             |              |        |

По литературным данным известно, что ДОК в КМ больных НМРЛ выявляются чаще при хорошо дифференцированных опухолях [160, 133]. Нами также проведен анализ частоты поражения КМ в зависимости от степени дифференцировки опухоли, по результатам которого установлена достоверная связь ( $p=0,023$ ) с данным признаком (Таблица 21). Как видно из таблицы, наибольшая частота выявления ДОК отмечена при высокодифференцированном раке (G1). При низкой дифференцировке ДОК выявлялись у 8 из 20 больных, что составило 40%. Аналогичные данные получены в исследовании SieneI W. и соавт., в котором проведенный анализ установил, что при дифференцированных опухолях (G1-G2) ДОК в КМ обнаруживались чаще (32%), чем при опухолях с низкой (G3- G4) дифференцировкой (4%,  $p = 0,03$ ) [113].

**Таблица 21** – Частота выявления ДОК в зависимости от степени дифференцировки опухоли

| Степень дифференцировки опухоли |         | ДОК         |              | Всего  |
|---------------------------------|---------|-------------|--------------|--------|
|                                 |         | отсутствуют | присутствуют |        |
| Низкая<br>G3                    | Частота | 12          | 8            | 20     |
|                                 | Процент | 60,0%       | 40%          | 100,0% |
| Умеренная<br>G2                 | Частота | 20          | 11           | 31     |
|                                 | Процент | 64,5%       | 35,5%        | 100,0% |

|               |         |       |        |        |
|---------------|---------|-------|--------|--------|
| Высокая<br>G1 | Частота | 0     | 4      | 4      |
|               | Процент | 0,0%  | 100,0% | 100,0% |
| Всего         | Частота | 32    | 23     | 55     |
|               | Процент | 60,4% | 39,6%  | 100,0% |
| p=0,023       |         |       |        |        |

### Резюме

Таким образом, по результатам проведенного анализа взаимосвязи ДОК статуса с клинико-морфологическими характеристиками опухоли, установлено, что ДОК при НМРЛ выявляются в 43,5% случаев, при этом даже у больных с локализованным опухолевым процессом. Последнее отражает, что гематогенное метастазирование начинается на ранних этапах развития НМРЛ. Отмечено, что ДОК достоверно чаще обнаруживаются при высоко дифференцированном раке, что согласуется с литературными данными. Последний факт весьма интересен и требует более глубокого изучения на большей выборке больных.

### 3.2. Основные показатели миелограммы больных НМРЛ и их взаимосвязь с ДОК

В литературе встречаются публикации по результатам научных исследований, сообщающие об особенностях гранулоцито- и эритропоэза у онкологических больных. Мы провели изучение показателей миелограмм у всех больных НМРЛ и установили, что некоторые параметры были связаны с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Следует отметить, что в начале анализа были исключены случаи разбавления КМ кровью на основании суммарного содержания клеток эритроидного ростка в КМ менее 5%. Проведенный анализ взаимосвязи размеров опухоли с характеристиками гранулоцитарного ростка обнаружил снижение индекса созревания нейтрофилов, которое наблюдалось чаще при небольших размерах первичной опухоли,  $p=0,021$  (Таблица 22).

**Таблица 22** – Взаимосвязь индекса созревания нейтрофилов больных НМРЛ с размером опухоли (символ Т)

| Размер опухоли<br>(Т) | Индекс созревания нейтрофилов |              |          |
|-----------------------|-------------------------------|--------------|----------|
|                       | Снижен, n (%)                 | Норма, n (%) | Итого    |
| T1a                   | 1 (33,3)                      | 2 (66,7)     | 3 (100%) |
| T1b                   | 4 (100,0)                     | 0 (0,0)      | 4 (100%) |
| T2a                   | 16 (57,1)                     | 12 (42,9)    | 28(100%) |
| T2b                   | 7 (100,0)                     | 0 (0,0)      | 7(100%)  |
| T3                    | 4 (50,0)                      | 4 (50,0)     | 8(100%)  |
| T4                    | 3 (42,9)                      | 4 (57,1)     | 7(100%)  |
| Итого                 | 35 (61,4)                     | 22 (38,6)    | 57(100%) |
| p=0,021               |                               |              |          |

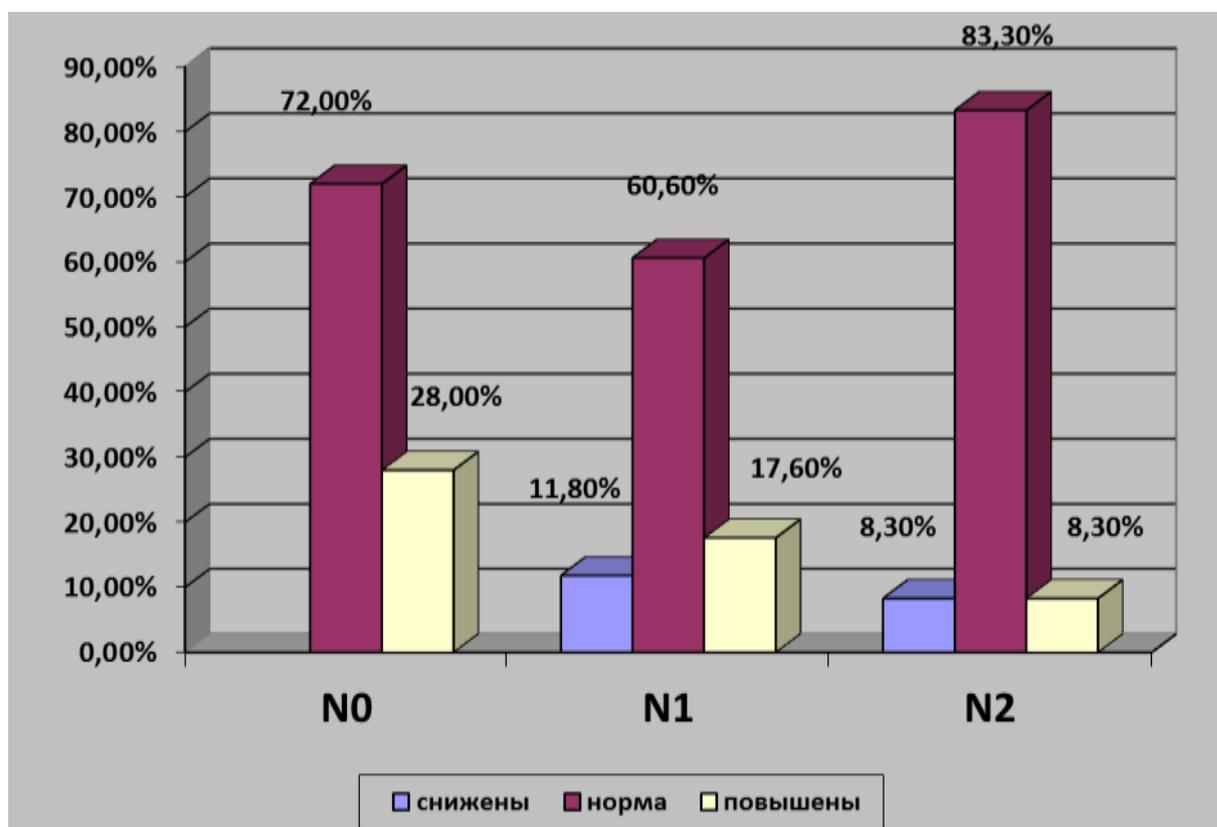
Также отмечено, что индекс созревания нейтрофилов был связан со стадией опухолевого процесса, что отражено в таблице 23. Как видно из таблицы, снижение данного показателя чаще наблюдалось при II стадии НМРЛ – 89,5%, p=0,006.

**Таблица 23** – Взаимосвязь индекса созревания нейтрофилов больных НМРЛ со стадией опухолевого процесса

| Стадия     | Индекс созревания нейтрофилов |              |          |
|------------|-------------------------------|--------------|----------|
|            | Снижен, n (%)                 | Норма, n (%) | Итого    |
| I стадия   | 9 (52,9)                      | 8 (47,1)     | 17(100%) |
| II стадия  | 17 (89,5)                     | 2 (10,5)     | 19(100%) |
| III стадия | 8 (53,3)                      | 7 (46,7)     | 15(100%) |
| IV стадия  | 1(16,7)                       | 5 (83,3)     | 6(100%)  |
| Итого      | 35 (61,4%)                    | 22 (38,6)    | 57(100%) |
| p=0,006    |                               |              |          |

Далее нами проведена оценка взаимосвязи между показателями миелограммы и индексом N. Сравнение статуса лимфатических узлов с параметрами миелограммы обнаружило наличие связи с содержанием

палочкоядерных нейтрофилов в образцах КМ больных НМРЛ, что представлено на рисунке 16. Как видно из рисунка, при интактных лимфатических узлах (N0) содержание палочкоядерных нейтрофилов было повышено в 28,0% случаев, тогда как при стадии N2 повышенные уровни палочкоядерных нейтрофилов отмечены в меньшем проценте образцов КМ (8,3%). При этом сниженное содержание палочкоядерных нейтрофилов чаще отмечалось при стадии N1 по сравнению со стадией N2 (11,8% против 8,3%). При отсутствии метастазов в лимфатических узлах случаев снижения уровня палочкоядерных нейтрофилов не наблюдалось. Полученные данные о корреляции содержания палочкоядерных нейтрофилов и индекса N носили достоверный характер,  $p=0,020$ .



**Рисунок 16** – Взаимосвязь поражения лимфатических узлов с уровнем палочкоядерных нейтрофилов в КМ больных НМРЛ

Поскольку в литературе есть указания, что гемопоэз имеет отличия у больных, у которых установлено поражением КМ, очередным этапом нашей работы было проведение анализа показателей миелограмм больных НМРЛ в зависимости от наличия в КМ опухолевых клеток. Как уже упоминалось выше, в

начале анализа были исключены случаи разбавления КМ кровью на основании суммарного содержания клеток эритроидного ростка в КМ менее 5%. Полученные данные представлены в таблице 24. Как видно из таблицы, при оценке средних значений показателей миелограмм в зависимости от ДОК статуса достоверных отличий в группах с наличием и отсутствием ДОК в КМ не выявлено. Обращает на себя внимание более низкая клеточность КМ при наличии в нем ДОК: 61,1 тыс/мкл против 81,1 тыс/мкл ( $p>0,05$ ). В исследовании Рябчикова Д.А. и соавт., проведенном при раке молочной железы показано, что при ДОК-положительном статусе содержание миелокариоцитов в 1,6 раз достоверно ниже, чем при отсутствии ДОК (57,5 тыс/мкл против 94,9 тыс/мкл) [19].

Анализируя, средние значения также нельзя не отметить, что ДОК-позитивные образцы КМ, характеризуются повышенным лейко-эритронормобластическим соотношением (9,5 против 6,8), хотя различия статистически не значимы.

**Таблица 24** – Показатели миелограммы в зависимости от наличия ДОК в КМ больных НМРЛ

| Показатели миелограммы     | ДОК          | N  | Среднее | Стд. ошибка среднего | p     |
|----------------------------|--------------|----|---------|----------------------|-------|
| Клеточность                | отсутствуют  | 30 | 81,0    | 11,5                 | >0,05 |
|                            | присутствуют | 25 | 61,1    | 8,8                  | >0,05 |
| Бластные клетки            | отсутствуют  | 34 | 1,2     | 0,10                 | >0,05 |
|                            | присутствуют | 27 | 1,2     | 0,14                 | >0,05 |
| Промиелоциты               | отсутствуют  | 34 | 0,3     | 0,06                 | >0,05 |
|                            | присутствуют | 27 | 0,5/    | 0,09                 | >0,05 |
| Миелоциты                  | отсутствуют  | 34 | 9,10    | 0,51                 | >0,05 |
|                            | присутствуют | 27 | 8,83    | 0,61                 | >0,05 |
| Метамиелоциты              | отсутствуют  | 34 | 8,27    | 0,53                 | >0,05 |
|                            | присутствуют | 27 | 7,40    | 0,53                 | >0,05 |
| Нейтрофилы палочкоядерные  | отсутствуют  | 34 | 20,28   | 0,81                 | >0,05 |
|                            | присутствуют | 27 | 18,96   | 1,04                 | >0,05 |
| Нейтрофилы сегментоядерные | отсутствуют  | 34 | 25,20   | 1,70                 | >0,05 |
|                            | присутствуют | 27 | 27,70   | 2,49                 | >0,05 |
| Эозинофилы палочкоядерные  | отсутствуют  | 34 | 0,85    | 0,11                 | >0,05 |
|                            | присутствуют | 27 | 0,87    | 0,08                 | >0,05 |

|  |              |    |       |      |       |
|--|--------------|----|-------|------|-------|
| Эозинофилы<br>сегментоядерные                    | отсутствуют  | 34 | 1,53  | 0,18 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 1,26  | 0,11 | >0,05 |
| Базофилы<br>сегментоядерные                      | отсутствуют  | 34 | 0,16  | 0,02 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 0,16  | 0,04 | >0,05 |
| Все клетки<br>гранулоцитарного ростка            | отсутствуют  | 34 | 66,12 | 1,36 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 66,08 | 1,58 | >0,05 |
| Индекс созревания<br>нейтрофилов                 | отсутствуют  | 34 | 0,40  | 0,02 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 0,36  | 0,02 | >0,05 |
| Моноциты   | отсутствуют  | 34 | 3,73  | 0,26 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 3,63  | 0,24 | >0,05 |
| Лимфоциты  | отсутствуют  | 34 | 11,45 | 0,93 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 12,06 | 0,87 | >0,05 |
| Плазматические клетки                            | отсутствуют  | 34 | 0,86  | 0,10 | >0,05 |
|  | присутствуют | 26 | 0,97  | 0,12 | >0,05 |
| Нормобласты<br>базофильные                       | отсутствуют  | 34 | 0,81  | 0,11 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 0,85  | 0,12 | >0,05 |
| Нормобласты<br>полихроматофильные                | отсутствуют  | 34 | 8,31  | 0,70 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 8,45  | 0,67 | >0,05 |
| Нормобласты<br>оксифильные                       | отсутствуют  | 34 | 7,21  | 0,65 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 6,74  | 0,54 | >0,05 |
| Все клетки эритроидного<br>ростка                | отсутствуют  | 34 | 16,33 | 1,27 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 16,05 | 1,19 | >0,05 |
| Индекс созревания                                | отсутствуют  | 34 | 0,97  | 0,00 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 0,95  | 0,00 | >0,05 |
| Лейко-<br>эритронормобластическое<br>соотношение | отсутствуют  | 34 | 6,80  | 0,95 | >0,05 |
|  | присутствуют | 27 | 9,55  | 3,54 | >0,05 |

Следующим этапом мы проанализировали изменения показателей гемопоэза в зависимости от обнаруженного количества ДОК в КМ больных НМРЛ. При этом пороговые значения были следующие: 1, 2, 3 и 4 клетки на 10 млн. миелокарицитов. В таблице 25, представлены результаты анализа показателей гранулоцитарного, эритроидного ростка, уровней моноцитов, лимфоцитов, плазматических клеток образцов КМ, в которых обнаружено  $\geq 1,00$  ДОК/10 млн. миелокарицитов.

**Таблица 25** – Показатели гемопоэза при наличии ДОК в КМ при пороговом значении 1 клетка на 10 млн миелокарицитов

| Показатели миелограммы                    | ДОК (клетки на 10млн. миелокарицитов) | N  | Среднее | Стд. ошибка среднего | p     |
|---|---------------------------------------|----|---------|----------------------|-------|
| Клеточность                               | >= 1,00                               | 15 | 61,9    | 12,470               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 36 | 82,1    | 9,744                | >0,05 |
| Промиелоциты                              | >= 1,00                               | 17 | ,38     | ,10649               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | ,49     | ,07371               | >0,05 |
| Миелоциты                                 | >= 1,00                               | 17 | 9,57    | ,68017               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 9,37    | ,40055               | >0,05 |
| Метамиелоциты                             | >= 1,00                               | 17 | 7,62    | ,60268               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 8,50    | ,44729               | >0,05 |
| Нейтрофилы палочкоядерные                 | >= 1,00                               | 17 | 19,92   | 1,36542              | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 20,43   | ,66444               | >0,05 |
| Нейтрофилы сегментоядерные                | >= 1,00                               | 17 | 26,41   | 1,69033              | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 23,73   | 1,41021              | >0,05 |
| Все клетки гранулоцитарного роста         | >= 1,00                               | 17 | 66,48   | 1,64258              | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 65,61   | 1,22868              | >0,05 |
| Индекс созревания нейтрофилов             | >= 1,00                               | 17 | ,37     | ,02782               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | ,41     | ,02452               | >0,05 |
| Моноциты                                  | >= 1,00                               | 17 | 4,02    | ,29550               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 3,57    | ,23631               | >0,05 |
| Лимфоциты                                 | >= 1,00                               | 17 | 11,48   | ,80019               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 11,01   | ,67511               | >0,05 |
| Плазматические клетки                     | >= 1,00                               | 17 | ,96     | ,14270               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | ,95     | ,09432               | >0,05 |
| Нормобласты базофильные                   | >= 1,00                               | 17 | ,73     | ,12918               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | ,94     | ,11065               | >0,05 |
| Нормобласты полихроматофильные            | >= 1,00                               | 17 | 8,51    | ,70316               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 8,90    | ,60805               | >0,05 |
| Нормобласты оксифильные                   | >= 1,00                               | 17 | 6,67    | ,61582               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 7,40    | ,53239               | >0,05 |
| Все клетки эритроидного роста             | >= 1,00                               | 17 | 15,92   | 1,14814              | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 17,27   | 1,08988              | >0,05 |
| Индекс созревания                         | >= 1,00                               | 17 | ,97     | ,01139               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | ,96     | ,00775               | >0,05 |
| Лейко-эритронормобластическое соотношение | >= 1,00                               | 17 | 5,93    | ,74784               | >0,05 |
|   | < 1,00                                | 40 | 5,77    | ,56219               | >0,05 |

Как видно из таблицы, средние значения основных параметров миелограммы в сравниваемых группах не отличались, за исключением клеточности КМ (61,93 тыс. кл.\мкл против 82,17 тыс. кл.\мкл), и одного показателя гранулоцитарного ростка - уровня сегментоядерных нейтрофилов (26,4% против 23,73%). Однако эти различия не носили достоверного характера.

Сравнение показателей гемопоэза при пороговом значении определяемых в КМ ДОК 2 кл. на 10 млн. миелокариоцитов также не выявило существенных отличий (таблица 26).

**Таблица 26** – Показатели гемопоэза при наличии ДОК в КМ при пороговом значении 2 клетки на 10 млн. миелокариоцитов

| Показатели миелограммы             | ДОК     | N  | Среднее | Стд. ошибка среднего | p     |
|------------------------------------|---------|----|---------|----------------------|-------|
| Клеточность                        | >= 2,00 | 15 | 61,93   | 48,297               | >0,05 |
|                                    | < 2,00  | 36 | 82,17   | 58,462               | >0,05 |
| Промиелоциты                       | >= 2,00 | 17 | ,3824   | ,43908               | >0,05 |
|                                    | < 2,00  | 40 | ,4900   | ,46619               | >0,05 |
| Миелоциты                          | >= 2,00 | 17 | 9,5706  | 2,80441              | >0,05 |
|                                    | < 2,00  | 40 | 9,3775  | 2,53332              | >0,05 |
| Метамиелоциты                      | >= 2,00 | 17 | 7,6294  | 2,48490              | >0,05 |
|                                    | < 2,00  | 40 | 8,5000  | 2,82888              | >0,05 |
| Нейтрофилы палочкоядерные          | >= 2,00 | 17 | 19,9235 | 5,62978              | >0,05 |
|                                    | < 2,00  | 40 | 20,4300 | 4,20227              | >0,05 |
| Нейтрофилы сегментоядерные         | >= 2,00 | 17 | 26,4176 | 6,96942              | >0,05 |
|                                    | < 2,00  | 40 | 23,7325 | 8,91896              | >0,05 |
| Все клетки гранулоцитарного ростка | >= 2,00 | 17 | 66,4882 | 6,77254              | >0,05 |
|                                    | < 2,00  | 40 | 65,6150 | 7,77087              | >0,05 |
| Индекс созревания нейтрофилов      | >= 2,00 | 17 | ,3765   | ,11472               | >0,05 |
|                                    | < 2,00  | 40 | ,4175   | ,15506               | >0,05 |
| Моноциты                           | >= 2,00 | 17 | 4,0235  | 1,21836              | >0,05 |
|                                    | < 2,00  | 40 | 3,5750  | 1,49456              | >0,05 |

|  |             |    |         |         |         |
|--|-------------|----|---------|---------|---------|
| Лимфоциты                                | $\geq 2,00$ | 17 | 11,4824 | 3,29929 | $>0,05$ |
|  | $< 2,00$    | 40 | 11,0125 | 4,26976 | $>0,05$ |
| Плазматические клетки                    | $\geq 2,00$ | 17 | ,9647   | ,58837  | $>0,05$ |
|  | $< 2,00$    | 40 | ,9575   | ,59652  | $>0,05$ |
| Нормобласты базофильные                  | $\geq 2,00$ | 17 | ,7353   | ,53261  | $>0,05$ |
|  | $< 2,00$    | 40 | ,9450   | ,69980  | $>0,05$ |
| Нормобласты полихроматофильные           | $\geq 2,00$ | 17 | 8,5176  | 2,89919 | $>0,05$ |
|  | $< 2,00$    | 40 | 8,9075  | 3,84564 | $>0,05$ |
| Нормобласты оксифильные                  | $\geq 2,00$ | 17 | 6,6765  | 2,53908 | $>0,05$ |
|  | $< 2,00$    | 40 | 7,4200  | 3,36713 | $>0,05$ |
| Все клетки эритроидного ростка           | $\geq 2,00$ | 17 | 15,9294 | 4,73389 | $>0,05$ |
|  | $< 2,00$    | 40 | 17,2725 | 6,89299 | $>0,05$ |
| Индекс созревания                        | $\geq 2,00$ | 17 | ,9706   | ,04697  | $>0,05$ |
|  | $< 2,00$    | 40 | ,9625   | ,04903  | $>0,05$ |
| Лейко-эритрономобластическое соотношение | $\geq 2,00$ | 17 | 5,9353  | 3,08341 | $>0,05$ |
|  | $< 2,00$    | 40 | 5,7775  | 3,55560 | $>0,05$ |

При пороговом уровне 3 ДОК на 10 млн. миелокариоцитов клеточность КМ составляла 67,56% и 78,07% соответственно, уровни сегментоядерных нейтрофилов (26,4% против 23,73%), различия не были достоверны (таблица 27). Средние значения других показателей гранулоцитарного ростка, а также эритроидного ростка, уровни лимфоцитов и моноцитов не различались.

**Таблица 27** – Показатели гемопоэза при наличии ДОК в КМ при пороговом значении 3 клетки на 10 млн. миелокариоцитов

| Показатели миелограммы | ДОК         | N  | Среднее | Стд. ошибка среднего | p       |
|------------------------|-------------|----|---------|----------------------|---------|
| Клеточность            | $\geq 3,00$ | 9  | 67,56   | 20,476               | $>0,05$ |
|                        | $< 3,00$    | 42 | 78,07   | 8,541                | $>0,05$ |
| Промиелоциты           | $\geq 3,00$ | 11 | ,4455   | ,11230               | $>0,05$ |
|                        | $< 3,00$    | 46 | ,4609   | ,07057               | $>0,05$ |
| Миелоциты              | $\geq 3,00$ | 11 | 9,4091  | ,71458               | $>0,05$ |
|                        | $< 3,00$    | 46 | 9,4413  | ,39342               | $>0,05$ |

|   |             |    |         |         |         |
|---|-------------|----|---------|---------|---------|
| Метамиелоциты                             | $\geq 3,00$ | 11 | 7,9000  | ,88902  | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | 8,3217  | ,40013  | $>0,05$ |
| Нейтрофилы палочкоядерные                 | $\geq 3,00$ | 11 | 19,7545 | 1,58455 | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | 20,4043 | ,66628  | $>0,05$ |
| Нейтрофилы сегментоядерные                | $\geq 3,00$ | 11 | 25,7545 | 1,45623 | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | 24,2413 | 1,33911 | $>0,05$ |
| Все клетки гранулоцитарного роста         | $\geq 3,00$ | 11 | 65,8091 | 2,28515 | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | 65,8913 | 1,10414 | $>0,05$ |
| Индекс созревания нейтрофилов             | $\geq 3,00$ | 11 | ,3727   | ,03042  | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | ,4130   | ,02255  | $>0,05$ |
| Моноциты                                  | $\geq 3,00$ | 11 | 3,8182  | ,32413  | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | 3,6826  | ,22149  | $>0,05$ |
| Лимфоциты                                 | $\geq 3,00$ | 11 | 11,0909 | ,99173  | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | 11,1674 | ,61368  | $>0,05$ |
| Плазматические клетки                     | $\geq 3,00$ | 11 | 1,1636  | ,19035  | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | ,9109   | ,08474  | $>0,05$ |
| Нормобласты базофильные                   | $\geq 3,00$ | 11 | ,8636   | ,18205  | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | ,8870   | ,09955  | $>0,05$ |
| Нормобласты полихроматофильные            | $\geq 3,00$ | 11 | 9,2182  | ,87488  | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | 8,6891  | ,55009  | $>0,05$ |
| Нормобласты оксифильные                   | $\geq 3,00$ | 11 | 6,7364  | ,67289  | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | 7,3087  | ,49108  | $>0,05$ |
| Все клетки эритроидного роста             | $\geq 3,00$ | 11 | 16,8182 | 1,46336 | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | 16,8848 | ,98233  | $>0,05$ |
| Индекс созревания                         | $\geq 3,00$ | 11 | ,9545   | ,01575  | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | ,9674   | ,00699  | $>0,05$ |
| Лейко-эритронормобластическое соотношение | $\geq 3,00$ | 11 | 5,6364  | 1,05514 | $>0,05$ |
|   | $<3,00$     | 46 | 5,8696  | ,50242  | $>0,05$ |

В таблице 28, представлены результаты исследования характеристик миелограмм при наличии в КМ  $\geq 4,00$  ДОК и  $<4,00$ . Как видно из таблицы, средние значения в сравниваемых группах не различались ни по одному из параметров.

**Таблица 28** – Показатели гемопоэза при наличии ДОК в КМ при пороговом значении 4 клетки на 10 млн. миелокариоцитов

| Показатели миелограммы             | ДОК         | N  | Среднее | Стд. ошибка среднего | p       |
|------------------------------------|-------------|----|---------|----------------------|---------|
| Клеточность                        | $\geq 4,00$ | 7  | 74,71   | 25,982               | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 44 | 76,45   | 8,233                | $>0,05$ |
| Промиелоциты                       | $\geq 4,00$ | 9  | ,4556   | ,12146               | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | ,4583   | ,06866               | $>0,05$ |
| Миелоциты                          | $\geq 4,00$ | 9  | 9,2333  | ,85505               | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | 9,4729  | ,37867               | $>0,05$ |
| Метамиелоциты                      | $\geq 4,00$ | 9  | 8,3000  | 1,04748              | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | 8,2292  | ,38873               | $>0,05$ |
| Нейтрофилы палочкоядерные          | $\geq 4,00$ | 9  | 20,1222 | 1,93116              | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | 20,3083 | ,64209               | $>0,05$ |
| Нейтрофилы сегментоядерные         | $\geq 4,00$ | 9  | 25,7667 | 1,38464              | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | 24,3021 | 1,29976              | $>0,05$ |
| Все клетки гранулоцитарного ростка | $\geq 4,00$ | 9  | 66,2333 | 2,47398              | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | 65,8083 | 1,08504              | $>0,05$ |
| Индекс созревания нейтрофилов      | $\geq 4,00$ | 9  | ,3778   | ,03643               | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | ,4104   | ,02173               | $>0,05$ |
| Моноциты                           | $\geq 4,00$ | 9  | 3,6000  | ,35746               | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | 3,7292  | ,21464               | $>0,05$ |
| Лимфоциты                          | $\geq 4,00$ | 9  | 10,9111 | 1,08531              | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | 11,1979 | ,59637               | $>0,05$ |
| Плазматические клетки              | $\geq 4,00$ | 9  | 1,2444  | ,21545               | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | ,9063   | ,08210               | $>0,05$ |
| Нормобласты базофильные            | $\geq 4,00$ | 9  | ,7889   | ,20578               | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | ,9000   | ,09653               | $>0,05$ |
| Нормобласты полихроматофильные     | $\geq 4,00$ | 9  | 9,3556  | 1,02240              | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | 8,6854  | ,53029               | $>0,05$ |
| Нормобласты оксифильные            | $\geq 4,00$ | 9  | 6,4778  | ,73858               | $>0,05$ |
|                                    | $<4,00$     | 48 | 7,3333  | ,47410               | $>0,05$ |

|   |             |    |         |         |         |
|---|-------------|----|---------|---------|---------|
| Все клетки эритроидного ростка            | $\geq 4,00$ | 9  | 16,6222 | 1,65276 | $>0,05$ |
|   | $<4,00$     | 48 | 16,9188 | ,94993  | $>0,05$ |
| Индекс созревания                         | $\geq 4,00$ | 9  | ,9667   | ,01667  | $>0,05$ |
|   | $<4,00$     | 48 | ,9646   | ,00698  | $>0,05$ |
| Лейко-эритронормобластическое соотношение | $\geq 4,00$ | 9  | 5,7889  | 1,27535 | $>0,05$ |
|   | $<4,00$     | 48 | 5,8313  | ,48394  | $>0,05$ |

Таким образом, данный этап работы, посвященный проведению анализа показателей миелограмм больных НМРЛ в зависимости от количества в КМ опухолевых клеток достоверных различий не выявил, хотя обращает на себя внимание низкая клеточность КМ и изменение уровня зрелых форм гранулоцитарного ростка. Однако это не означает, что количество ДОК в КМ не имеет влияния на гемопоэз. Следует отметить, что в нашем исследовании количество ДОК, обнаруженных в КМ больных НМРЛ, было невелико и лишь в отдельных образцах КМ выявлено большое количество ДОК. Возможно, требуется большое количество наблюдений для уточнения характера изменений.

Следующим разделом нашей работы стало проведение анализа сопряженности признаков. Изучив таблицу 29 сопряженности признаков, мы отметили, что в группе больных НМРЛ у которых имелось поражение КМ, в 4,0% случаев наблюдалось снижение суммы клеток гранулоцитарного ростка ( $p=0,036$ ) по сравнению группой, у которой в КМ отсутствовали ДОК (12,5%), при этом у 7 из 25 ДОК позитивных больных сумма гранулоцитарного ростка была повышена. Аналогичные результаты получены в исследовании по меланоме, но в большем проценте случаев (8% - при наличии ДОК в КМ,  $p = 0,012$ ) [52]. Возможно, что выявленные закономерности касаются более поздних стадий, поскольку в нашем исследовании преобладали больные с начальными стадиям опухолевого процесса.

**Таблица 29** – Сумма клеток гранулоцитарного ростка в зависимости от ДОК статуса больных НМРЛ

| ДОК в КМ     |         | Сумма клеток гранулоцитарного ростка |       |          | Итого  |
|--------------|---------|--------------------------------------|-------|----------|--------|
|              |         | снижена                              | норма | повышена |        |
| отсутствуют  | Частота | 4                                    | 11    | 17       | 32     |
|              | Процент | 12,5%                                | 34,4% | 53,1%    | 100,0% |
| присутствуют | Частота | 1                                    | 17    | 7        | 25     |
|              | Процент | 4,0%                                 | 68,0% | 28,0%    | 100,0% |
| Итого        | Частота | 5                                    | 28    | 24       | 57     |
|              | Процент | 8,8%                                 | 49,1% | 42,1%    | 100,0% |
| p=0,036      |         |                                      |       |          |        |

При детальном анализе показателей гранулоцитарного ростка КМ больных НМРЛ у 72% больных НМРЛ при наличии ДОК в КМ отмечено снижение промиелоцитов, при отсутствии ДОК – в 84,4 %. Данные представлены в таблице 30. Изменения не носили достоверного характера.

**Таблица 30** – Взаимосвязь уровня промиелоцитов с ДОК статусом у больных НМРЛ

| ДОК в КМ     |         | Уровни промиелоцитов |       | Итого  |
|--------------|---------|----------------------|-------|--------|
|              |         | снижены              | норма |        |
| отсутствуют  | Частота | 27                   | 5     | 32     |
|              | Процент | 84,4%                | 15,6% | 100,0% |
| присутствуют | Частота | 18                   | 7     | 25     |
|              | Процент | 72,0%                | 28,0% | 100,0% |
| Итого        | Частота | 45                   | 12    | 57     |
|              | Процент | 78,9%                | 21,1% | 100,0% |
| p= 0,25      |         |                      |       |        |

Снижение миелоцитов при поражении КМ наблюдалось лишь у 8 % больных против 18,8% больных, у которых отсутствовали ДОК в КМ, однако эти отличия статистически не значимы. Полученные результаты представлены в таблице 31.

**Таблица 31** – Взаимосвязь уровня миелоцитов с ДОК статусом у больных НМРЛ

| ДОК в КМ     |         | Уровни миелоцитов |       |          | Итого  |
|--------------|---------|-------------------|-------|----------|--------|
|              |         | снижены           | норма | повышены |        |
| отсутствуют  | Частота | 6                 | 24    | 2        | 32     |
|              | Процент | 18,8%             | 75,0% | 6,2%     | 100,0% |
| присутствуют | Частота | 2                 | 21    | 2        | 25     |
|              | Процент | 8,0%              | 84,0% | 8,0%     | 100,0% |
| Итого        | Частота | 8                 | 45    | 4        | 57     |
|              |         | 14,0%             | 78,5% | 7,5%     | 100,0% |
| p= 0,30      |         |                   |       |          |        |

У большинства больных (68,0%), в КМ которых установлено наличие ДОК, был снижен индекс созревания гранулоцитов, в то время как при ДОК негативном статусе только у 56,3% больных отмечалось снижение индекса созревания гранулоцитов (таблица 32). Разница не была статистически значима (p= 0,36).

**Таблица 32** – Взаимосвязь индекса созревания гранулоцитов с ДОК статусом у больных НМРЛ

| ДОК в КМ     |         | Индекс созревания гранулоцитов |       | Итого  |
|--------------|---------|--------------------------------|-------|--------|
|              |         | снижен                         | норма |        |
| отсутствуют  | Частота | 18                             | 14    | 32     |
|              | Процент | 56,2%                          | 43,8% | 100,0% |
| присутствуют | Частота | 17                             | 8     | 25     |
|              | Процент | 68,0%                          | 32,0% | 100,0% |
| Итого        | Частота | 35                             | 22    | 57     |
|              | Процент | 61,4%                          | 38,6% | 100,0% |
| p= 0,36      |         |                                |       |        |

Далее нами были проанализированы соотношения показателей эритроидного ростка с поражением КМ больных НМРЛ. Оценив эту взаимосвязь, мы обнаружили, что в 43,5% (n=27) ДОК - позитивных случаев у больных НМРЛ отмечено снижение полихроматофильных форм, по сравнению с ДОК негативными случаями (56,5%, n=35). Оценка сопряженности уровней оксифильных нормобластов с ДОК статусом показала, что повышение

оксифильных нормобластов наблюдалось в 72% образцов КМ, в котором присутствовали ДОК, а при негативных случаях лишь у 58,1% отмечено повышение оксифильных форм. Полученные данные представлены в таблице 33. Различия не носили достоверного характера.

**Таблица 33** – Взаимосвязь уровня оксифильных нормобластов с ДОК статусом у больных НМРЛ

| ДОК в КМ     |         | Уровни оксифильных нормобластов |          | Итого  |
|--------------|---------|---------------------------------|----------|--------|
|              |         | норма                           | повышены |        |
| отсутствуют  | Частота | 13                              | 18       | 31     |
|              | Процент | 41,9%                           | 58,1%    | 100,0% |
| присутствуют | Частота | 7                               | 18       | 25     |
|              | Процент | 28,0%                           | 72,0%    | 100,0% |
| Итого        | Частота | 20                              | 36       | 56     |
|              | Процент | 35,7%                           | 64,3%    | 100,0% |
| p=0,27       |         |                                 |          |        |

Сумма клеток эритроцитарного ростка у большинства больных с ДОК позитивным статусом была в норме, в то время как при отсутствии ДОК - у 56,5%. Что касается лейко-эритронормобластического соотношения, то оно было повышено более чем у половины ДОК позитивных больных: 56,0% (14 из 25) против 62,5%. Полученные результаты не были статистически значимы.

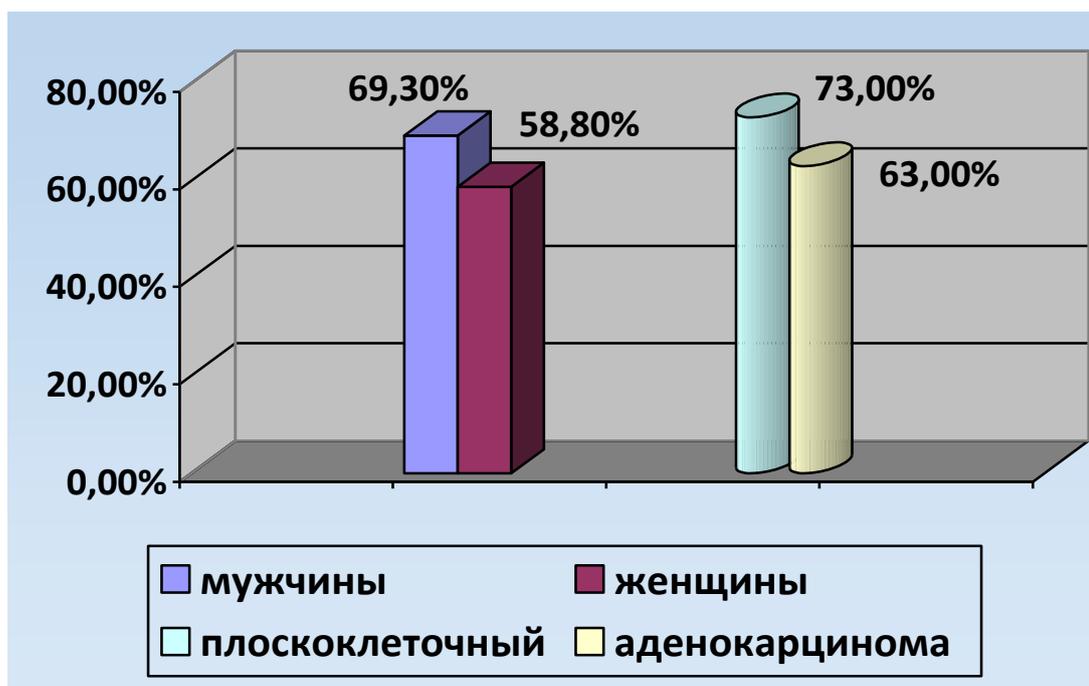
Отдельный интерес представляла оценка показателей миелограмм в тех случаях, в которых ДОК выявлены при пороговом уровне 1 клетка на 1 млн. миелокариоцитов. Сразу отметим, что статистически значимых отличий с ДОК негативным статусом не установлено. Интересно, что клеточность у 3 (75%) больных, у которых имелось поражение КМ, была в норме, при этом у всех наблюдалось повышение количества бластных клеток и нормальное содержание миелоцитов.

## Резюме

Резюмируя проведенный анализ наличия взаимосвязи между ДОК статусом и показателями миелограммы больных НМРЛ, следует признать, что есть тенденция к перестройке КМ микроокружения ДОК, однако не все описанные наблюдения носили достоверный характер. Возможно, это связано с тем, что в нашем исследовании преобладали больные с ранними операбельными стадиями НМРЛ и количество выявленных ДОК у большинства больных не превышало 10 на 20 млн. миелокариоцитов. Вероятно, изменения в КМ происходят постепенно и зависят от количества ДОК и их активности.

### **3.3. Лимфоцитарные популяции костного мозга и их взаимосвязь с морфологическими характеристиками опухоли, параметрами миелограммы**

При изучении лимфоцитарных популяций КМ первым этапом проведена оценка среднего содержания зрелых Т-клеток и их субпопуляций. Среднее содержание зрелых Т-клеток (CD3+) в анализируемой группе больных (n=42) составило 67,1% (31,3 – 82%). У мужчин содержание зрелых Т-лимфоцитов было достоверно более высоким, чем у женщин ( $69,3 \pm 2,1\%$ , n=33 и  $58,8 \pm 2,96\%$ , n=9),  $p=0,01$  (рисунок 17). При плоскоклеточном раке уровни CD3+ лимфоцитов в КМ больных были более высокими (в среднем 73%, n=19), чем при аденокарциноме (в среднем 63%, n=22),  $p=0,003$ , что отображено на рисунке 15. Уровни CD8+ лимфоцитов также были достоверно более высокими у мужчин:  $32,4 \pm 1,8\%$  (n=32) и  $23,6 \pm 2,0\%$  (n=9),  $p=0,003$ . Уровни CD4+ лимфоцитов не различались в зависимости от пола ( $p=0,9$ ).



**Рисунок 17** – Уровни Т-клеток в зависимости от пола больных, гистологического вида НМРЛ

Следующим этапом мы оценили, насколько пол пациентов взаимосвязан с уровнями Т-клеток и CD8-лимфоцитов при аденокарциноме легкого. Следует отметить, что в нашем исследовании имелась четкая связь гистологического диагноза с полом больных ( $p=0,00$ ), что представлено в таблице 34. Как видно из таблицы, женщин, больных плоскоклеточным раком легкого, в анализируемой группе не было. В то же время аденокарцинома наблюдалась с примерно равной частотой у мужчин и женщин.

**Таблица 34** – Связь гистологического типа НМРЛ с полом больных

| Пол больных |         | Гистология      |                | Итого  |
|-------------|---------|-----------------|----------------|--------|
|             |         | плоскоклеточный | аденокарцинома |        |
| Мужской     | Частота | 28              | 22             | 50     |
|             | Процент | 56,0%           | 44,0%          | 100,0% |
| Женский     | Частота | 0               | 16             | 16     |
|             | Процент | 0,0%            | 100,0%         | 100,0% |
| Итого       | Частота | 28              | 38             | 66     |
|             | Процент | 42,4%           | 57,6%          | 100,0% |

Итак, по результатам анализа связи пола и уровня лимфоцитов оказалось, что при аденокарциноме легкого имелось некоторое преобладание CD3 и CD8-клеток у мужчин, хотя достоверных различий не получено. Результаты представлены в таблице 35. Эти данные свидетельствуют о том, что уровни CD3 и CD8-лимфоцитов в КМ больных раком легкого более вероятно ассоциированы с гистологическим диагнозом, нежели с полом пациентов.

**Таблица 35** – Уровни CD3+ лимфоцитов и CD8+ лимфоцитов у мужчин и женщин больных аденокарциномой легкого

| Показатель | Пол     | N  | Среднее | Стандартная<br>ошибка среднего | p    |
|------------|---------|----|---------|--------------------------------|------|
| CD3+       | мужской | 13 | 66,62   | 3,39                           | 0,12 |
|            | женский | 9  | 58,84   | 2,95                           |      |
| CD8+       | мужской | 13 | 29,89   | 2,69                           | 0,1  |
|            | женский | 9  | 23,59   | 2,00                           |      |

Исходя из высокой ассоциации гистологического типа НМРЛ с полом, достоверно более высокие уровни CD8+ лимфоцитов отмечены при ПКР, чем при АК:  $34,1 \pm 2,4\%$  (n=19) и  $27,3 \pm 1,9\%$  соответственно,  $p=0,03$ .

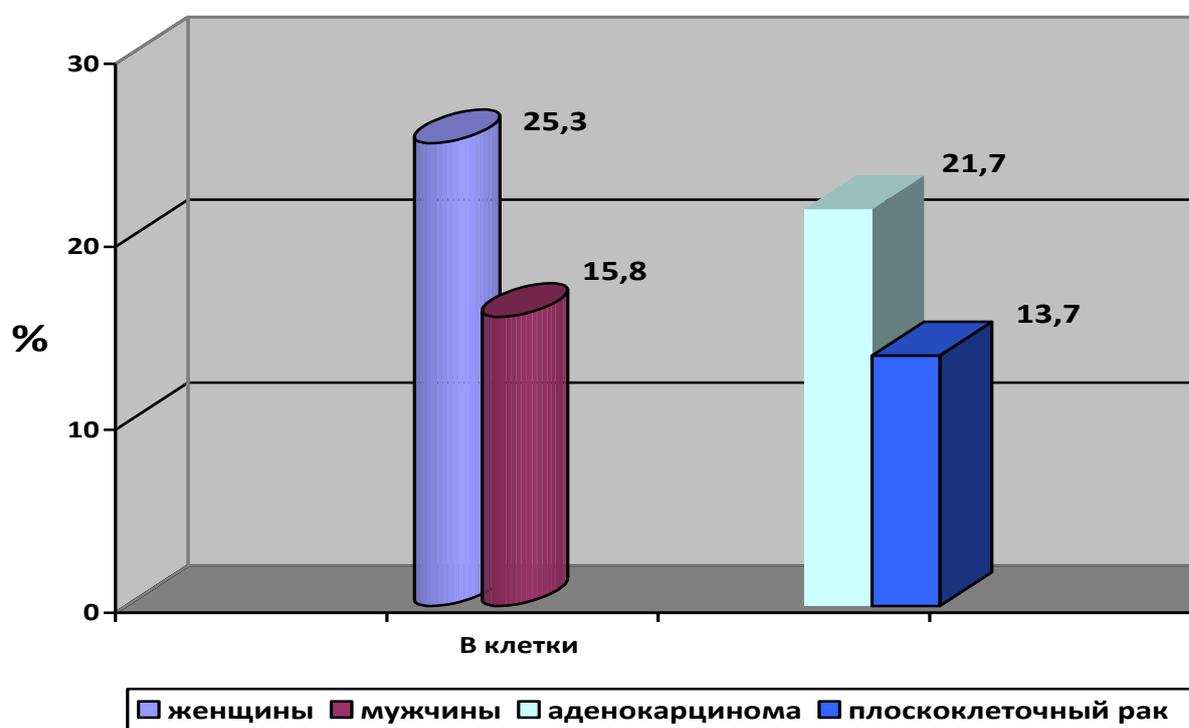
Сравнение связи гистологического типа опухоли и уровня CD4+ лимфоцитов подобной закономерности не выявило ( $p=0,35$ ).

Отдельный интерес представляло проведение сравнения субпопуляций Т-клеток с клинико-морфологическими признаками. Выполненное нами сравнение в гейте Т-клеток показало, что субпопуляции Т-цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+) достоверно не различались в зависимости от пола больных,  $p=0,127$ . Аналогично, и гистологические типы рака легкого (плоскоклеточный, аденокарцинома) не различались по уровням цитотоксических CD3+CD8+ лимфоцитов,  $p=0,52$ . Следующим этапом мы провели сравнение средних значений НК-клеток (CD16+CD3-). Проведенный анализ показал, что связь с полом уровня субпопуляций НК-клеток (CD16+CD3-) отсутствовала ( $p=0,52$ ). Различий в

уровнях костномозговых НК-клеток при разных гистологических типах НМРЛ также не установлено,  $p=0,57$ .

Таким образом, по результатам проведенного анализа отмечен факт преобладания зрелой Т-клеточной популяции лимфоцитов КМ (CD3), CD8+ лимфоцитов у мужчин, и при плоскоклеточном типе НМРЛ.

Далее нами проводилось сравнение содержания популяции В-клеток КМ больных НМРЛ в зависимости от пола, гистологического вида НМРЛ. Проведенный анализ выявил ряд интересных закономерностей. Уровни популяций В-клеток КМ больных НМРЛ были связаны с полом больных. Зрелые В-клетки (CD20+CD45++) достоверно преобладали у женщин:  $25,3\pm 4,97\%$  ( $n=7$ ) и  $15,8\pm 1,8\%$  ( $n=26$ ),  $p=0,032$ . При изучении взаимоотношений морфологического типа НМРЛ и уровня В-лимфоцитов обнаружилось, что CD20+CD45++клетки также преобладали при АК легкого в сравнении с ПКР:  $21,7\pm 3,1\%$  ( $n=17$ ) и  $13,7\pm 1,4\%$  ( $n=16$ ). Различия статистически значимы:  $p=0,025$ . Полученные данные отображены на рисунке 18. Учитывая взаимосвязь гистологического вида НМРЛ с полом в анализируемой группе больных, представляло большой интерес провести сравнительный анализ уровней В-клеток в зависимости от пола при АК. Результаты показали, что различий по уровням CD20+ лимфоцитов не получено: мужчины –  $19,2\pm 3,9\%$  ( $n=10$ ), женщины –  $25,3\pm 4,97\%$  ( $n=7$ ),  $p=0,35$ . Таким образом, есть все основания считать более высокие уровни зрелых костномозговых В-лимфоцитов характерными для АК легкого.



**Рисунок 18** – Уровни В-клеток в зависимости от пола больных, гистологического вида НМРЛ

Учитывая важность эффекторных Т-клеточных популяций в реализации противоопухолевого эффекта и потенциальную перспективу их использования для повышения эффективности противоопухолевого иммунитета, дальнейшей анализ был посвящен перфорин-содержащим лимфоцитам. Мы изучили перфорин-содержащие лимфоциты, их связь с полом больных НМРЛ. Это исследование проведено у 38 больных. При исследовании перфорин-содержащих лимфоцитов КМ нами не установлено связи с полом, что представлено в таблице 36.

**Таблица 36** – Средние уровни перфорин-позитивных лимфоцитов КМ у мужчин и женщин больных НМРЛ

| Популяция лимфоцитов | Пол     | N  | Среднее | Стд. ошибка среднего | p    |
|----------------------|---------|----|---------|----------------------|------|
| CD8+Перфорин+        | мужской | 30 | 10,8    | 1,8                  | 0,67 |
|                      | женский | 8  | 9,0     | 3,9                  |      |
| CD45+Перфорин+       | мужской | 30 | 21,2    | 3,0                  |      |

|                |         |    |      |     |      |
|----------------|---------|----|------|-----|------|
|                | женский | 8  | 18,8 | 3,9 | 0,7  |
| CD8-Перфорин+  | мужской | 30 | 13,2 | 1,7 |      |
|                | женский | 8  | 14,3 | 4,1 | 0,78 |
| CD4+Перфорин+  | мужской | 30 | 6,9  | 2,0 |      |
|                | женский | 8  | 5,1  | 1,1 | 0,65 |
| CD4-Перфорин+  | мужской | 30 | 19,8 | 2,3 |      |
|                | женский | 8  | 15,6 | 4,5 | 0,42 |
| CD27+Перфорин+ | мужской | 30 | 1,5  | 0,3 |      |
|                | женский | 8  | 1,1  | 0,5 | 0,59 |

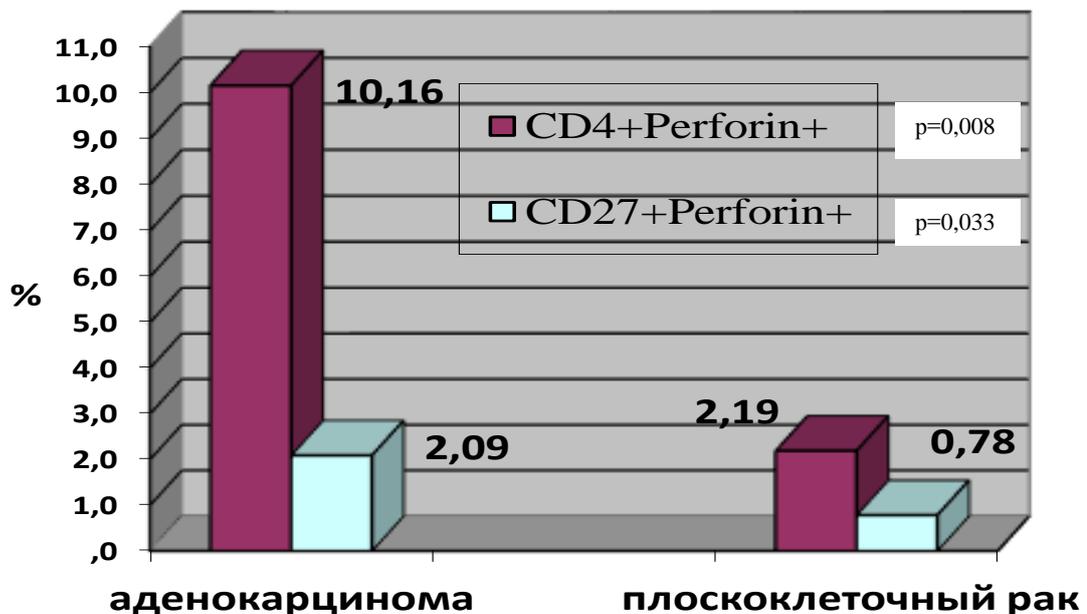
Далее нами был проведен анализ взаимосвязи уровней минорных субпопуляций перфорин-содержащих лимфоцитов КМ с гистологическим видом опухоли. Полученные данные представлены в таблице 37.

**Таблица 37** – Средние уровни перфорин-позитивных лимфоцитов КМ больных АК и ПКР легкого

| Субпопуляция лимфоцитов | гистология      | N  | Среднее | Стд. ошибка среднего | p     |
|-------------------------|-----------------|----|---------|----------------------|-------|
| CD8+Перфорин+           | плоскоклеточный | 17 | 10,0    | 1,7                  |       |
|                         | аденокарцинома  | 21 | 10,8    | 2,7                  | 0,82  |
| CD45+Перфорин+          | плоскоклеточный | 17 | 18,2    | 2,3                  |       |
|                         | аденокарцинома  | 21 | 22,7    | 4,2                  | 0,38  |
| CD8-Перфорин+           | плоскоклеточный | 17 | 12,1    | 1,2                  |       |
|                         | аденокарцинома  | 21 | 14,5    | 2,7                  | 0,48  |
| CD4+Перфорин+           | плоскоклеточный | 17 | 2,1     | 0,4                  |       |
|                         | аденокарцинома  | 21 | 10,1    | 2,6                  | 0,008 |
| CD4-Перфорин+           | плоскоклеточный | 17 | 20,0    | 2,4                  |       |
|                         | аденокарцинома  | 21 | 18,1    | 3,2                  | 0,67  |
| CD27+Перфорин+          | плоскоклеточный | 17 | 0,78    | 0,1                  |       |
|                         | аденокарцинома  | 21 | 2,0     | 0,5                  | 0,033 |

Средние уровни CD8+Перфорин+ при разных гистологических типах не отличались. Уровни субпопуляции CD45+Перфорин+ составили 18,2% при ПКР и 22,7% при АК,  $p=0,38$ . Различия в содержании CD8-Перфорин+лимфоцитов были незначительны и соответствовали 12,1% и 14, 3%. Средние уровни CD4-Перфорин+лимфоцитов составили 20,0% и 18,1% при ПКР и АК соответственно. Достоверные различия заключались в преобладании перфорин-позитивных CD4-лимфоцитов и перфорин-позитивных CD27+лимфоцитов при АК в сравнении с ПКР, что отражено на рисунке 19.

Обнаружение CD4+Перфорин+, CD27+Перфорин+ лимфоцитов в КМ больных НМРЛ, а также наличие достоверной связи данных популяций с гистологическим типом опухоли является новым фактом, который требует более детального изучения и на большей выборке больных.



**Рисунок 19** – Уровень содержания CD4 Перфорин+, CD27+Перфорин+лимфоцитов КМ в зависимости от гистологического типа НМРЛ

CD4+ Т-клетки с цитотоксической активностью, как известно, выявляются при различных иммунных реакциях, играя важную роль в противоопухолевом иммунитете. Эти клетки характеризуются способностью секретировать гранзим В

и перфорин и убивать клетки-мишени в контексте рестрикции HLA-II класса. По последним научным исследованиям, установлено, что эти клетки наиболее близки Th1 (Т-хелперы 1-го типа), секретирующим интерферон- $\gamma$ . Кроме того, сообщается, что идентифицирован подкласс наивных Т-клеток, способных дифференцироваться в CD4- цитотоксические лимфоциты. Интересно, что CD4-цитотоксические лимфоциты рассматриваются как потенциальные мишени в терапии злокачественных новообразований [168].

На следующем этапе работы выполнен анализ уровня перфорин-содержащих клеток во взаимосвязи с показателями гемопоэза у больных НМРЛ. Отметим, что с этой целью нами исключались из анализа случаи разбавления КМ кровью, как это было упомянуто выше. Корреляционные связи морфологически выявляемых клеточных типов КМ с перфорин-содержащими лимфоцитарными субпопуляциями представлены в таблице 38.

Как видно из таблицы, миелоидные и эритроидные предшественники находятся в отрицательной корреляционной связи с перфорин-позитивными клетками. Это не исключает регуляторного влияния соответствующих клеток с цитотоксическим потенциалом на ранние этапы дифференцировки эритроидных и миелоидных предшественников. Для перфорин-содержащих клеток отмечены положительные корреляционные связи со зрелыми нейтрофилами и уровнем лимфоцитов. Интересно отметить, что обе минорные перфорин-содержащие субпопуляции, более высокие уровни которых наблюдались при аденокарциноме легкого (CD4, CD27), были взаимосвязаны с определенными показателями миелограммы.

**Таблица 38** – Корреляционные связи перфорин-содержащих лимфоцитарных популяций КМ больных НМРЛ с клетками гемопоэза.

| Клеточные типы и индексы миелограммы | Перфорин-содержащие лимфоцитарные субпопуляции |                   |                   |                    |
|--------------------------------------|--|-------------------|-------------------|--------------------|
|                                      | CD45+<br>Перфорин+                             | CD8+<br>Перфорин+ | CD4+<br>Перфорин+ | CD27+<br>Перфорин+ |
| Миелоциты                            | -0,340*<br>0,042**<br>36***                    | -                 | -                 | -                  |

|   |        |        |       |        |
|---|--------|--------|-------|--------|
| Сегментоядерные<br>нейтрофилы           | 0,548  | 0,567  | -     | -      |
|   | 0,001  | 0      |       |        |
|   | 36     | 36     |       |        |
| Индекс созревания<br>нейтрофилов        | -0,363 | -0,408 | -     | -      |
|   | 0,029  | 0,014  |       |        |
|   | 36     | 36     |       |        |
| Лимфоциты                               | -      | -      | 0,471 | -      |
|   |        |        | 0,004 |        |
|   |        |        | 36    |        |
| Нормобласты<br>базофильные              | -0,397 | -0,399 | -     | -      |
|   | 0,017  | 0,016  |       |        |
|   | 36     | 36     |       |        |
| Нормобласты<br>полихроматофильные       | -0,701 | -      | -     | -      |
|   | 0      |        |       |        |
|   | 36     |        |       |        |
| Сумма клеток<br>эритроидного ростка     | -      | -      | -     | -0,349 |
|   |        |        |       | 0,037  |
|   |        |        |       | 36     |
| Индекс созревания<br>эритроидных клеток | -      | -      | -     | -0,33  |
|   |        |        |       | 0,05   |
|   |        |        |       | 36     |

Примечание: «-» - отсутствие достоверных корреляционных связей; \* - коэффициент корреляции (R); \*\* - уровень значимости различий (p), \*\*\* - количество больных (n).

Таким образом, в результате проведенного анализа взаимосвязей показателей миелограмм с лимфоцитарными популяциями, содержащими перфорин, для них установлены достоверные прямые корреляции с уровнем сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, и обратные с миелоцитами, индексом созревания нейтрофилов, полихроматофильными и базофильными нормобластами, суммой клеток эритроидного ростка, индексом созревания эритроидных клеток.

### Резюме

Резюмируя, изложенные выше результаты данного раздела работы, следует подчеркнуть, что при исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов КМ нами впервые показано, что ПКР характеризуются в большей степени Т- и НК-клеточными проявлениями иммунитета, а АК – гуморального иммунитета. Кроме того, нами установлен факт достоверно более высоких показателей CD27-позитивных клеток, экспрессирующих перфорин, при АК легкого. Вероятнее

всего речь идет об эффекторных Т-клетках памяти, на которых коэкспрессия данных молекул (гранзим В, перфорин) возможна.

Взаимосвязь субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток КМ с миелокариоцитами при злокачественных опухолях отмечалась в целом ряде публикаций. Описаны особенности гемопоэза, связанные с накоплением оксифильных нормобластов, что являлось фактором, препятствующим развитию анемии при ряде лимфом [23-26]. В другом исследовании выявлены особенности эритро- и гранулоцитопоэза у больных меланомой, которые были связаны с наличием ДОК в КМ [52]. Реципрокные взаимоотношения популяции НК-клеток КМ с эритроидными предшественниками установлены при раке молочной железы [175].

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена многоплановая работа, и она нуждается в обсуждении по целому ряду аспектов. Во-первых, необходимо обсудить вопросы поражения КМ при раке легкого. Во-вторых, интересными для обсуждения представляются выявленные в работе взаимосвязи с гемопоэзом. И, наконец, эффекторные субпопуляции лимфоцитов противоопухолевого иммунитета, их локализация в КМ пациентов.

Начнем с диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в КМ больных раком легкого. Как оказалось, частота их обнаружения велика – почти половина случаев (43,5%). Вместе с тем, обнаруживаемое количество клеток столь ничтожно (1-2 клетки на 10 миллионов миелокариоцитов), что, вполне возможно, они не будут иметь клинического значения, или для его оценки потребуются длительные сроки наблюдения. Именно поэтому мы называем данные клетки не метастатическими, а диссеминированными (ДОК).

Очень важным является методологический аспект обнаружения ДОК в КМ больных НМРЛ. Нами применен метод многопараметровой проточной цитометрии. Этот метод хорошо зарекомендовал себя при выявлении минимальной остаточной болезни при гемобластозах (острые лейкозы, множественная миелома, хронический лимфолейкоз), где чувствительность составляет 1 опухолевая клетка на 10 000 – 100 000 миелокариоцитов. Для выявления ДОК в КМ больных НМРЛ такая чувствительность недостаточна. Как показали наши данные, лишь у одного больного использование чувствительности метода  $10^{-5}$  позволило выявить опухолевые клетки, в этом случае их количество составило 484 клетки на 20 000 000 миелокариоцитов, то есть  $2,4 \times 10^{-5}$ ,  $24 \times 10^{-6}$  или  $242 \times 10^{-7}$ . Для повышения чувствительности метода мы применили подход, основанный на анализе очень большого числа клеток КМ (10 – 20 млн). Поскольку современные цитометры не позволяют накопить такое количество событий, мы анализировали несколько проб по 1-2 млн., а затем полученные данные объединяли с помощью программы KALUZA. К положительным клеткам (ДОК) относили таковые, экспрессирующие общеэпителиальный антиген Ерсат при отсутствии общелейкоцитарного антигена CD45. Эти клетки, как правило,

характеризовались низкими характеристиками SSC (боковое рассеяние света лазерного луча в терминах проточной цитометрии). Следует отметить, что морфологическим методом при просмотре двумя опытными гематоцитологами 6 мазков КМ у каждого больного поражение выявлено лишь в одном случае. У остальных больных даже при выявлении проточно-цитометрическим методом высокого содержания ДОК эти клетки на мазках КМ не выявлялись.

Следует отметить, что даже в случае наиболее высокого содержания ДОК в КМ (484 клетки на 20 млн. миелокариоцитов) каких-либо клинических особенностей у больного не отмечено. Это был мужчина 56 лет с умеренно дифференцированным ПКР легкого T2a, N1, M0, Стадия IIa. Имели место лишь некоторые неспецифические отклонения от нормы в миелограмме: гиперклеточный КМ (229 тыс / мкл), со сниженным относительным содержанием метамиелоцитов (6,4%), сниженным индексом созревания нейтрофилов (0,4) и повышением оксифильных нормобластов (7,6%).

Разумеется, мы не ожидали обнаружить клинические особенности в группе пациентов с наличием ДОК в КМ.

Не обнаружено связи с полом, возрастом пациентов, гистологическим диагнозом НМРЛ, стадией рака, размерами опухоли (T), наличием метастазов в лимфатических узлах. При наличии отдаленных метастазов ДОК выявлялись в половине случаев.

Чрезвычайно интересным фактом, подтверждающим данные литературы, явилось установление достоверной связи факта обнаружения ДОК в КМ со степенью дифференцировки опухолевых клеток (G). Достоверно чаще ( $p=0,023$ ) ДОК выявлялись при высокодифференцированном раке (G1).

А теперь обратимся к гемопоэзу. Как реагирует костномозговое кроветворение на опухолевое поражение легких? Есть ли особенности гемопоэза, присущие раку легкого? Вопрос отнюдь не праздный. Ведь речь идет о двух дыхательных органах: в легких происходит насыщение гемоглобина эритроцитов кислородом, а в КМ создаются эти эритроциты, в зависимости от потребностей организма в кислороде эритропоэз может быть усилен или, напротив, угнетен.

Анализ гемопоэза при опухолях начал проводиться сравнительно недавно. Наиболее типичным является нарастание уровня оксифильных эритробластов, которое может рассматриваться как своего рода компенсаторный механизм, препятствующий развитию анемии у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой, фолликулярной лимфомой, меланомой, раком молочной железы [23, 24, 52, 175]. А как же ведет себя гемопоэз при раке легкого?

Во-первых, мы оценили взаимосвязь состояния кроветворения с наличием диссеминированных опухолевых клеток в КМ больных НМРЛ. Установлена достоверная взаимосвязь между общим количеством клеток гранулоцитарного ростка и наличием ДОК. При наличии ДОК реже наблюдались случаи снижения или повышения уровней клеток гранулоцитарного ростка ( $p=0,036$ ).

В последние годы отмечается большой интерес к исследованиям не только гемопоэза в целом, но и эритропоэза, в частности, при опухолях. Мы проанализировали эффекторные перфорин-содержащие лимфоидные клетки КМ во взаимосвязи с показателями гемопоэза у больных раком легкого. Случаи разбавления КМ кровью были исключены на основании суммарного содержания клеток эритроидного ростка в КМ менее 5%.

Корреляционные связи морфологически выявляемых клеточных типов КМ с перфорин-содержащими лимфоцитарными субпопуляциями представлены в табл. 37.

Как видно, миелоидные и эритроидные предшественники находятся в отрицательной корреляционной связи с перфорин-позитивными клетками. Это не исключает регуляторного влияния соответствующих клеток с цитотоксическим потенциалом на ранние этапы дифференцировки эритроидных и миелоидных предшественников. Положительные корреляции имели место для перфорин-содержащих клеток со зрелыми нейтрофилами и уровнем лимфоцитов. На наш взгляд очень важным является впервые установленный в работе факт того, что нарастание эритроидного ростка (как возможный компенсаторный механизм, препятствующий развитию анемии) идет в параллели со снижением общего количества перфорин-содержащих клеток (CD45+ перфорин+), а также их

субпопуляций (CD8, CD4, CD27). Особого внимания заслуживает чрезвычайно высокая отрицательная корреляция перфорин-содержащих лимфоцитов с полихроматофильными нормобластами. Возможно, именно эти клетки являются мишенью цитотоксического влияния лимфоцитов КМ. Иными словами, нарастание цитотоксического потенциала костномозговых лимфоцитов сопровождается снижением клеток эритроидного ростка КМ.

Взаимосвязь субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток КМ с миелокариоцитами представляет интерес как с точки зрения понимания регуляции гемопоэза, так и с точки зрения особенностей, присущих различным опухолям. В ряде наших публикаций отмечались особенности гемопоэза, связанные с накоплением оксифильных нормобластов, что являлось фактором, препятствующим развитию анемии при ряде лимфом [23,24,26]. Для определения оксифильных нормобластов нами был предложен проточно-цитометрический метод [25]. Особенности гемопоэза при меланоме были связаны с поражением костного мозга [52]. Более того, реципрокные взаимоотношения костномозговых НК-клеток с эритроидными предшественниками имели место при раке молочной железы [175].

Одним из наиболее интересных разделов работы явилось изучение костномозговых показателей иммунитета у больных НМРЛ. И здесь выявились интересные закономерности. Для ПКР легкого в сравнении с АК характерными оказались показатели зрело-Т-клеточного иммунитета и повышение уровней цитотоксических CD8+ лимфоцитов (Т-клетки и НК-клетки).

Для АК легкого отмечены более высокие уровни зрелых В-лимфоцитов (CD20+CD45++), то есть клеточной составляющей гуморального иммунитета.

Это совершенно новое положение в области изучения рака легкого, которое открывает возможности различного воздействия иммунными препаратами у больных ПКР легкого и АК в зависимости от накопления терминальных этапов клеточной дифференцировки Т- и В-лимфоцитов в КМ больных.

Дальнейший, более углубленный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов КМ больных НМРЛ подтвердил эти положения. Дело в том, что Т-

хелперное (CD4) звено КМ, которое во многом (но не исключительно) взаимосвязано с помощью в реализации гуморального иммунитета, например, путем продукции ИЛ-6 и ряда других интерлейкинов оказалось более выраженным у больных АК легкого. В данном случае CD4-лимфоциты проявились с совсем неожиданной стороны. Стало возможным говорить об их цитотоксическом потенциале (перфорин-позитивные клетки). Это известная, но минорная субпопуляция клеток, роль которых при раке легкого ещё предстоит изучить, в особенности, с позиций представительства в КМ [168].

В данной работе мы оценили, как традиционные субпопуляции лимфоцитов – Т-клетки (CD3) и их субпопуляции (CD4, CD8), зрелые В-лимфоциты (CD20), НК-клетки, так и ряд минорных или эффекторных популяций (CD4+CD25++, CD27, Perforin+). Исследование впервые проведено в КМ больных раком легкого с параллельным детальным изучением миелограммы пациентов.

Уже на первом этапе обратили на себя внимание выраженные различия иммунологических профилей субпопуляционного состава лимфоцитов КМ больных ПКР и АК. Т-клеточные субпопуляции (CD3) и CD8-лимфоциты (Т- и НК-клетки) достоверно преобладали у больных ПКР легкого. А более высокие уровни зрелых В-лимфоцитов КМ были характерны для АК. Вполне возможно, что принятие во внимание более характерного для той или иной гистологической формы рака варианта иммунного ответа (Т-, НК-клеточного или гуморального) позволит более направленно планировать таргетную и иммунотерапию у больных. Вместе с тем, нельзя не отметить, высокую ассоциацию пола больных с гистологическим вариантом опухоли – все 28 больных ПКР легкого были мужчины. Учитывая тот факт, что при АК легкого достоверных различий в уровнях CD3+ и CD8+ в зависимости о пола не получено, мы склонны связывать более высокие уровни эффекторных Т-клеток и CD8-клеток с гистологическим диагнозом ПКР легкого, а не с полом пациентов. Аналогичным образом, более высокие уровни зрелых В-клеток были характерными для АК легкого. Иными словами, при исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов КМ нами

впервые показано, что ПКР характеризуются в большей степени Т- и НК-клеточными проявлениями иммунитета, а АК – гуморального иммунитета.

Дальнейший анализ полученных данных был посвящен эффекторным субпопуляциям, воздействие на которые может использоваться для повышения эффективности противоопухолевого иммунитета. Эти перфорин-содержащие субпопуляции не имели связи с полом больных. Вместе с тем, установлена достоверная связь с гистологическим вариантом опухоли. Минорные популяции цитотоксических CD4-лимфоцитов и CD27-лимфоциты, содержащие перфорин, были более выраженными при АК легкого.

CD4+ Т-клетки с цитотоксической активностью, как известно, выявляются при различных иммунных реакциях, играя важную роль в противовирусном и противоопухолевом иммунитете. Эти клетки характеризуются способностью секретировать гранзим В и перфорин и убивать клетки-мишени в контексте рестрикции HLA-II класса. Считается, что эти клетки наиболее близки Th1 (Т-хелперы 1-го типа), секретирующим интерферон- $\gamma$ . Обнаружен подкласс наивных Т-клеток, способных дифференцироваться в CD4 ЦТЛ. CD4 ЦТЛ рассматриваются как потенциальные мишени для терапевтических целей [168].

Не менее интересен факт обнаружения достоверно более высоких показателей CD27-позитивных клеток, экспрессирующих перфорин, при АК легкого. Вероятнее всего речь идет об эффекторных Т-клетках памяти, на которых коэкспрессия данных молекул (гранзим В, перфорин) возможна (Таблица 39).

**Таблица 39** – Субпопуляции Т-клеток, экспрессирующих CD27 и эффекторные молекулы

| Субпопуляция<br>Т-клеток | CD27 | Гранзим А |     | Гранзим В |     |
|--------------------------|------|-----------|-----|-----------|-----|
|                          |      | CD4       | CD8 | CD4       | CD8 |
| Tn                       | ++   | -         | -   | -         | -   |
| Tscm                     | +    | -         | -   | -         | -   |
| Tcm                      | +    | -         | -/+ | -         | -   |
| Ttm                      | +    | -         | ++  | -         | +   |

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tem | -/+ | -/+ | +++ | -/+ | ++  |
| Tte | -   | +   | +++ | -/+ | +++ |

**Примечание:** субпопуляции Т-клеток: Tn - наивные, Tscm – стволовые клетки памяти, Tcm – клетки центральной памяти, Ttm – промежуточные клетки памяти, Tem – эффекторные клетки памяти, Tte – терминальные эффекторные клетки.

Наиболее интересно рассмотрение возможной роли CD27-положительных клеток КМ при раке легкого, а также возможностей использования полученных нами данных в иммунотерапии.

Как известно, для полной Т-клеточной активации требуется не только взаимодействие Т-клеточного рецептора с пептидом, представляемым молекулами главного комплекса гистосовместимости, но и близкодействующих (контактных) костимуляторных сигналов от аксессуарных не-Т-клеток. Первый костимуляторный рецептор CD28 был открыт с помощью анти-CD28 антител. Выявление дополнительных костимуляторных рецепторов началось с 1980-х годов с открытия Т-клеточных детерминант, распознаваемых вновь синтезированными антителами. Большое количество этих антител усиливали Т-клеточную пролиферацию только в комбинации с реагентами, индуцирующими триггеринг Т-клеточного рецептора, что подтверждало истинное существование костимуляторных сигналов. На основании структурных характеристик костимуляторные рецепторы могут быть сгруппированы первоначально на таковые, принадлежащие к иммуноглобулиновому суперсемейству (CD28, ICOS, CD226), или к суперсемейству рецепторов TNF (CD27, OX40, 4-1BB, индуцируемый глюкокортикоидами родственный TNF-рецептору белок, рецептор смерти 3 и CD30). В добавок, Т-клетки экспрессируют ингибиторные рецепторы (например, CTLA-4, PD-1, TIGIT, а также В- и Т-лимфоцитарно-ассоциированные (все они принадлежат к Ig-суперсемейству), которые негативно регулируют Т-клеточные ответы посредством внутренних или внеклеточных механизмов с CTLA-4 и PD-1, частично опосредуя их эффект посредством противодействия

костимуляторной активности CD28. Открытие того, что костимуляторные сигналы могут усиливать величину T-клеточного сигнала, а также получение эффекторных T-клеток и T-клеток памяти привели к наблюдению, что целевое воздействие на эти пути может усиливать клеточные иммунные ответы против опухолей или таковые, вызванные вакцинацией. И, напротив, блокада костимуляторных сигналов имеет потенциал усиливать явные T-клеточные ответы при аутоиммунных процессах и болезни трансплантат против хозяина, а также предупреждать отторжение после аллогенной трансплантации. Несмотря на впечатляющие результаты, лечение с CTLA-4-Ig не является полностью безопасным и современные подходы сфокусированы на комбинировании CTLA-4-Ig с блокадой дополнительных костимуляторных рецепторов. Интересной представляется возможность воздействия на костимуляторные молекулы, изучавшиеся в настоящей работе.

Молекула CD27 представляет собой трансмембранный гомодимер, связанный дисульфидными мостиками, который принадлежит к семейству рецепторов фактора некроза опухоли (рФНО) / рецептора фактора роста нервов (рФРН). Молекулярная масса антигена составляет 55 кДа. Гликопротеин CD27 обнаруживается на поверхности медуллярных тимоцитов, T-клеток периферической крови, субпопуляции зрелых B-клеток и NK-клеток. На поверхности T-клеток CD27 преимущественно экспрессируется на CD45RA+ CD45RO- субпопуляции наивных CD4+ T-лимфоцитов, тогда как в большинстве T-клеток памяти (CD45RA- CD45RO+) антиген CD27 отсутствует. Активация T-клеток приводит к повышению экспрессии CD27 на поверхности клетки, а также к высвобождению растворимой формы CD27 (sCD27). Лигандом для CD27 является антиген CD70, который относится к суперсемейству лигандов ФНО.

CD27 экспрессирован на покоящихся  $\alpha\beta$  CD4+ (T-reg и обычных T-клетках) и CD8+ T-клетках, а также на популяции сходных с врожденным иммунитетом V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-экспрессирующих T-клеток с противоопухолевой функцией. CD27 постоянно экспрессирован на наивных T-клетках. В пределах T-клеток человека экспрессия CD27 снижена на эффекторных клетках, но отчетливая на стволовых

клетках памяти и клетках, сходных с клетками центральной памяти. Напротив, терминально дифференцированные эффекторные клетки памяти (РА Т-клетки) и эффекторные клетки памяти представляют собой смешанные популяции как CD27+, так и CD27- подклассов; в то время как CD27+ клетки преобладают в эффекторной популяции памяти, эффекторные РА Т-клетки памяти в большинстве своем являются CD27-. Для НК-клеток потеря CD27 сходным образом ассоциирована с более эффекторно-подобной CD56-слабопозитивной популяцией, но даже в пределах CD56++ субпопуляции потеря CD27 ассоциирована с более высокой литической активностью. CD27 описан также на В-лимфоцитах, включая клетки зародышевых центров, памяти и плазматические клетки, но не на наивных или транзитных В-клетках. Функция CD27 на В-клетках не до конца понятна, хотя стимуляция CD70-трансфектированными клетками повышает продукцию IgG человеческими В-клетками *in vitro*. Важно то, что CD27 экспрессирован как на эффекторных, так и на регуляторных популяциях Т-клеток при иммунной патологии и раке, что делает обе популяции потенциальными мишенями CD27-таргетной терапии.

Агонисты CD27, как известно, стимулируют Т-клетки человека к пролиферации и цитокиновой продукции *in vitro*. В числе этих агонистов могут выступать лиганд CD70 или некоторые анти-CD27 моноклональные антитела. Более того, запускаемая через CD27 активация CD8<sup>+</sup> - Т-лимфоцитов может происходить напрямую без участия CD4 Т-хелперов. Способность CD27 напрямую стимулировать CD8<sup>+</sup> Т-клетки в сочетании с тем, что CD27 постоянно экспрессирован на наивных Т-клетках может быть необходимой для очистки организма от EBV-инфекции, поскольку для пациентов с отсутствием функционально активных CD27 или CD70 типичными являются инфекции вирусом Эпштейна-Барр у детей, ассоциированные с лимфомой Ходжкина. Более того, больные с дефектом CD27 или CD70 имеют часто персистирующие инфекции в детском возрасте. У этих больных отмечается снижение в различной степени клеток памяти (В, CD4, CD8), а также гипогаммаглобулинемия (это находится в соответствии с тем, что сигнал CD27 поддерживает продукцию IgG *in*

vitro), в то же время уровни относительного содержания Т-регуляторных клеток не изменяются.

Интересно отметить в этом контексте, что несмотря на явное снижение иммунитета к вирусу Эпштейна-Барр у этих больных, Т-клеточные пролиферативные ответы к другим митогенам в основном являются нормальными. Это свидетельствует о том, что CD70, уровни которого повышены на В-лимфоцитах в ответ на ЭБВ-инфекцию, являются важными для Т-клеточно-опосредованной иммунной защиты В-клеток в тех случаях, когда необходим сильный иммунный ответ, чтобы противостоять массивной В-клеточной пролиферации, как в случаях ЭБВ-инфекции.

В противоположность этому способность данных больных поддерживать удовлетворительные Т-клеточные ответы на иные достаточно распространенные патогены свидетельствует о том, что в ситуациях, когда антиген презентруется дендритными клетками, отсутствие сигнала CD27-CD70 может быть не лимитирующим.

Интересно рассмотреть функции данного антигена при раке. Усиление сигнала, передаваемого через CD27, предупреждает опухолевый рост. В качестве примера можно привести мышей, гиперэкспрессирующих CD70, и мышей, постоянно экспрессирующих CD70 на CD11c-позитивных клетках. Эти мыши дают более выраженные специфические CD8<sup>+</sup> Т-клеточные ответы и более эффективно отторгают опухолевые клетки, чем дикий тип этих животных с обычной экспрессией CD70.

Существуют подтверждения того, что сигнал CD27/CD70 играет роль в противоопухолевом иммунитете у человека [155]. Примерно у трети больных с врожденными дефицитами CD27 или CD70 развиваются лимфомы Ходжкина или диффузные В-крупноклеточные лимфомы. Соматические мутации или делеции в CD70 часто наблюдаются при лимфоме Беркитта и диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Показано, что, воздействуя на CD27, можно обойтись без необходимости сигнала CD40 и CD4<sup>+</sup> Т-клеточной помощи для того, чтобы запустить зависимое от CD8<sup>+</sup> Т-клеток отторжение опухоли у мышей.

В пределах опухолевого микроокружения антитела-агонисты мышинных CD27 стимулируют локальное накопление опухоли-специфичных и интерферон гамма-продуцирующих CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Варлилумаб (антитела к человеческим CD27) сходным образом вызывает CD8 Т-клеточно-зависимое отторжение опухоли у трансгенных по человеческому CD27 мышей. Эффективность варлилумаба зависит от его взаимодействия с Fc-рецепторами клеток хозяина.

Что касается стимуляции Т-регуляторных клеток варлилумабом, то можно отметить, что препарат лишь умеренно повышает пролиферацию Т-регуляторных клеток человека, и это может быть вторичным эффектом на повышенную доступность ИЛ-2. *In vivo* повышенная стимуляция с помощью МКА-агонистов CD27 снижала частоту Т-регуляторных клеток в мышинной опухоли, а варлилумаб сходным образом снижал уровень этих клеток в периферической крови больных раком. Следует отметить, что наиболее супрессивные человеческие Т-регуляторные клетки экспрессируют наиболее высокий уровень CD27, и представляется вероятным, что вследствие этого эти клетки избирательно деплетируются соответствующими анти-CD27 антителами, хотя это всего лишь предположение. Интригующим является факт того, что варлилумаб действует как прямой агонист Т-клеток и удаляет лимфомные клетки человека у иммунодефицитных мышей, однако, механизм пока не известен. Первые появившиеся данные указывают на то, что варлилумаб хорошо переносится и проявляет биологическую активность, соответствующую активации CD27, включая продукцию хемокинов, в особенности IP-10 (CXCL10), а также увеличение количества активированных эффекторных Т-клеток. Особенно важно, что эти первые исследования у человека показали, что варлилумаб является клинически активным препаратом и позволяет достигать достаточно выраженных ответов. В настоящее время проводится исследование варлилумаба в 6 клинических протоколах человека [155].

Наши данные свидетельствуют о том, что применение варлилумаба может быть обосновано, в первую очередь, при ПКР, где содержание CD27-позитивных

клеток с цитоплазматическим перфорином в КМ достоверно снижено в сравнении с АК.

## ВЫВОДЫ

1. Диссеминированные опухолевые клетки выявляются в костном мозге больных раком лёгкого с высокой частотой – 43,5% при использовании порогового уровня 1 клетки на 10 млн. миелокариоцитов ( $1 \times 10^{-7}$ ). При пороговых уровнях  $1 \times 10^{-6}$  и  $1 \times 10^{-5}$  частота поражения костного мозга составила 6,65% и 1,6%.

2. Случаи немелкоклеточного рака лёгкого с наличием диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге не имели клинических и морфологических особенностей: не установлено различий по полу, возрасту больных, размеру опухоли (T), наличию метастазов в регионарных лимфатических узлах (N), стадии заболевания. Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге не различалась при плоскоклеточном раке и аденокарциноме лёгкого. Диссеминированные опухолевые клетки выявлялись достоверно чаще при дифференцировке опухоли G1.

3. Выявление диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных немелкоклеточным раком лёгкого ассоциируется с определенными показателями гемопоэза и чаще наблюдается при нормальных уровнях гранулоцитарного ростка, чем в случаях снижения или повышения этих клеток.

4. Гистологические варианты немелкоклеточного рака лёгкого различаются по субпопуляционному составу клеток костного мозга: для плоскоклеточного рака лёгкого более характерным является повышение T-клеток (CD3) и CD8-клеток (T- и NK), а для аденокарциномы – зрелых B-клеток (CD45++ CD20+). Иными словами, для плоскоклеточного рака характерно напряжение звеньев T- и NK-клеточного иммунитета, а для аденокарциномы – гуморального иммунитета.

5. Эффекторные (перфорин-содержащие) субпопуляции костномозговых лимфоцитов достоверно различаются при аденокарциноме и плоскоклеточном раке лёгкого: для аденокарциномы характерны достоверно более высокие уровни перфорин-содержащих CD4-лимфоцитов и CD27-лимфоцитов.

6. Эффекторные субпопуляции лимфоцитов костного мозга находятся в реципрокных отношениях с предшественниками эритропоэза, что наиболее отчетливо проявляется на уровне полихроматофильных нормобластов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АК – аденокарцинома

ДОК – диссеминированные опухолевые клетки

КМ – костный мозг

НМРЛ – немелкоклеточный рак лёгкого

ПКР – плоскоклеточный рак

ALK – англ. anaplastic lymphoma kinase, ALK tyrosine kinase receptor – киназа (тирозинкиназный рецептор) анапластической лимфомы

BRAF – англ. B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase - человеческий ген (прото-онкоген) кодирующий белок B-Raf

CD – англ. cluster of differentiation - кластер дифференцировки

CTLA - 4 – англ. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 – белок, ассоциированный с цитотоксическими лимфоцитами 4 типа

EBV – англ. Epstein-Barr virus - Вирус Эпштейна - Барр

EGFR – англ. epidermal growth factor receptor – рецептор эпидермального фактора роста

LAK – англ. lymphokine-activated killer - лимфокин-активированные киллеры

MPR – англ. major morphological response – значимый патоморфологический ответ

NK клетки – англ. natural killer cells - клетки натуральные киллеры

PD-1 – англ. Programmed cell death 1 – программируемая клеточная гибель 1

PD-L1 – англ. Programmed death-ligand 1 - лиганд белка программируемой клеточной гибели 1

ROS 1 – англ. ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase - протоонкоген

R0 – радикальная резекция опухоли

TNM – (аббревиатура от tumor, nodus, metastasis) международная классификация стадий злокачественных новообразований

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абакушина, Е. В. Основные функции и свойства НК-клеток человека. / Е.В. Абакушина, Е. Г. Кузьмина, Е. И. Коваленко // Иммунология. – 2012. –Т.33, №4. – С. 220-224.
2. Бесова, Н.С. Прогностическое значение наличия диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных диссеминированным раком желудка до начала противоопухолевой терапии. / Н.С. Бесова, Е.С. Обаревич, М.М. Давыдов, О.А. Безнос, Н.Н. Тупицын // Фарматека. – 2017. - №17(350). С. 62-66.
3. Богуш, Т.А. Эстрогеновые рецепторы, антиэстрогены и немелкоклеточный рак легкого (Обзор) / Т.А. Богуш, Е.А.Дудко, А.А. Беме и др. // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 12. – С. 1633-1641.
4. Богомолова, О.А. Иммуноцитологический метод обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у больных раком молочной железы. / О.А. Богомолова, Н.Н. Тупицын, В.В. Родионов и др. // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2014. – Т. 25, №1–2. – С. 47-51.
5. Горбунова, Т.В. Сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга у детей при мелкоклеточных саркомах. / Т.В. Горбунова, В.Г. Поляков, И.Н. Серебрякова и др.// Иммунология. – 2012. – Т.33, №1. – С. 37-44.
6. 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.
7. 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.
8. Горбунова, Т.В. Клиническое значение исследования субпопуляций лимфоцитов костного мозга при саркомах у детей: дисс.... канд. мед. наук: 14.01.12 / Горбунова Татьяна Викторовна. – Москва, 2013. –120с.

9. Кадагидзе, З.Г. Иммунная система и рак. / З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова // Практическая онкология. – 2016. – Т.17, №2. – С. 62-73.
10. 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.35, №2. – С. 64-67.
11. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). /А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова// Москва. - 2019. – С. 250.
12. Колбанов, К.И. Хирургическое лечение больных резектабельным немелкоклеточным раком легкого. / К.И. Колбанов, А.Х. Трахтенберг, О.В. Пикин и др. // Исследования и практика в медицине. – 2014. – Т.1, №1. – С. 16-23.
13. Крохина, О. В. Микрометастазы рака молочной железы в костный мозг. Иммуноморфологическая диагностика: дисс.... мед. наук: 14.00.14 / Крохина Ольга Владимировна. – Москва, 2003. - 170 с.
14. Лактионов, К.К. Эффективность ниволумаба в процессе второй или последующей линии терапии и качество жизни у больных с распространенным рефрактерным немелкоклеточным раком легкого: промежуточные результаты проспективного наблюдательного исследования. / К.К. Лактионов, А.Л. Арзуманян, Л.В. Болотина и др. // Вопросы онкологии. – 2019. – Т.65, №1. – С. 99-105.
15. Лактионов, К.К. Станет ли неоадьювантная иммунотерапия новой парадигмой лечения больных раком легкого. / К.К. Лактионов, В.В. Бредер, Д.И. Юдин и др. // Медицинский совет. – 2019. №19. – С. 22-29.
16. Лактионов, К.К. Место иммуноонкологии в лечении немелкоклеточного рака. / К.К. Лактионов, К.А. Саранцева, В.В. Бредер и др. // Злокачественные опухоли. – 2016. –Т.19, №3. – С. 17-24.
17. Мкртчян, В.А. Взаимосвязь между НК-клетками костного мозга больных раком молочной железы и биологическими особенностями опухоли и эритропоезом. / В.А. Мкртчян, И.К. Воротников, О.А. Чернышева и др. // Онкогинекология. – 2019. №3. – С. 4-13.

18. Полоцкий, Б. Е. Хирургическое лечение больных немелкоклеточным раком легкого III стадии. / Б.Е. Полоцкий, М.И. Давыдов, И.С. Стилиди и др. // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2004. – С. 33-43.

19. Рябчиков, Д.А. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. / Д.А. Рябчиков, О.А. Безнос, И.А. Дудина и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т.17, №1. – С. 53-57.

20. Татарский, В.В. Липоапоптоз: механизм программируемой гибели клеток при действии липидов. / В.В. Татарский. // Иммунология гемопоза. – 2017. – №2. – С. 42-51.

21. Тимонина, Е. Г. Результаты исследования характеристик костного мозга больных плоскоклеточным раком головы и шеи, их клиническое значение. / Е.Г. Тимонина, Н. Н. Тупицын, С. О. Подвязников и др. // Опухоли головы и шеи. – 2016. – Т.6, №1. – С. 55-67.

22. Тупицын, Н.Н. Костный мозг онкологического больного: стадирование опухолей, гемопоз, иммунная система. / Н.Н. Тупицын // Иммунология гемопоза. – 2018. – Т.16, №2. – С. 10-54.

23. Тупицын, Н.Н. Роль костного мозга в прогнозе диффузной В-крупноклеточной лимфомы. / Н.Н. Тупицын, П.А. Зейналова, М.А. Френкель и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2015. №4. – С. 40-47.

24. Тупицын, Н.Н. Роль костного мозга в прогнозе фолликулярной лимфомы. / Н.Н. Тупицын, Н.А. Фалалеева, А.В. Моженкова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т.15, №3. – С. 99-102.

25. Тупицын, Н.Н. Иммунофенотипическое изучение дифференцировки эритрокариоцитов костного мозга у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. / Н.Н. Тупицын, Ц. Чэн, П.А. Зейналова. // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т.17, №4. – С. 52-57.

26. Фалалеева, Н.А. Особенности эритропоза больных фолликулярной лимфомой. / Н.А. Фалалеева, А.В. Моженкова, Е.А. Османов и др. // Вестник ФГБУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина". – 2016. – Т.27, №3. – С. 35-38.

27. 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.

28. Albain, KS. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. / KS. Albain, RS. Swann, VW. Rusch et al. // Lancet. – 2009. – Vol.374, №9687. – P. 379-86.

29. Allard, WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. / WJ Allard, J. Matera, MC Miller et al. // Clin Cancer Res. – 2004. – Vol.10, №20. – P. 6897-6904.

30. Allavena, P. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. / P. Allavena, A. Sica, G. Solinas et al. // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2008. – Vol.66, №1. – P.1-9.

31. Al-Shibli, K.I. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. / K.I. Al-Shibli, T. Donnem, S. Al-Saad et al. // Clin. Cancer Res. – 2008. – Vol.14, №16. – P. 5220-27.

32. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures. Atlanta, Georgia. // – 2018. – P.71.

33. 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.

34. Arguello, F. A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow. / F. Arguello, B.B. Baggs, C.N. Frantz // Cancer Res. – 1988. – Vol.48, – P. 6876-6881.

35. Asadzadeh, Z. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. / Z. Asadzadeh, H. Mohammadi, E. Safarzadeh et.al. // Cellular Immunology. – 2017. – Vol. 322, – P. 15-25.

36. Balic, M. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. / M. Balic, H. Lin, L. Young et.al. // *Clinical Cancer Res.* – 2006. – Vol.12, №19. – P. 5615-5621.

37. Banat, GA. Immune and inflammatory cell composition of human lung cancer stroma. / GA. Banat, A .Tretyn, SS. Pullamsetti et al. // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 9, №10. e0139073.

38. Bartkowiak, K. Discovery of a novel unfolded protein response phenotype of cancer stem/progenitor cells from the bone marrow of breast cancer patients. / K. Bartkowiak, KE. Effenberger, S. Harder et al. // *J Proteome Res.* – 2010. – Vol.6, №9. – P. 3158-3168.

39. Belal Ch., Eyad E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting./Belal Chaudhary and Eyad Elkord// *Vaccines.* – 2016. – Vol.28, №4.

40. Bragado, P. TGF-beta2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF-beta-RIII and p38a/beta signalling. / P. Bragado, Y. Estrada, F. Parikh et al. // *Nature cell Biology.* – 2013. – Vol.11, №15. – P. 1351-1361.

41. Braun, S. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk n breast cancer patients. / S. Braun, C. Kantenich, W. Janni et al. // *J Clin Oncol.* – 2000. – Vol.18, №1. – P. 80-86.

42. Braun, S. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. / S. Braun, G. Schlimok, I. Heumos et al. // *J Cancer Res.* – 2001. – Vol.61, №5. – P. 1890-1895.

43. Burris, HA. Safety and activity of Varlilumab, a Novel and First-in-Class Agonist anti-CD27 antibody, in patients with advanced solid tumors. / HA. Burris, JR. Infante, SM. Ansell et al. // *J Clin. Oncol.* – 2017. – Vol.18, № 35. – P. 2028-2036.

44. Caicun, Z. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. / Z. Caicun, W. Yi-Long, C. Gongyan et al. // *The Lancet Oncology.* – 2011. – Vol.8, №12. – P. 735-742.

45. Callea, M. PD-L1 expression in primary clear cell renal cell carcinomas (ccRCCs) and their metastases. / M. Callea, E.M. Genega, M. Gupta et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol.32, №4. – P. 467.

46. Calvi, L.M. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. / L.M. Calvi, G.B. Adams, K.W. Weibrecht et al. // *Nature.* 2003. – Vol.425, – P. 841-846.

47. Capietto, A.H. Immune regulation of bone metastasis. / A.H. Capietto, R. Faccio // *Bonekey Rep.* – 2014. – Vol.3, 600.

48. Cascone, T. Neoadjuvant nivolumab (N) or nivolumab plus ipilimumab (NI) for resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): Clinical and correlative results from the NEOSTAR study. / T. Cascone, W.N. William, A. Weissferdt A et al. // *J Clin. Oncol.* – 2019. – Vol.37, №15. 8504.

49. Chae, Y.K. Biomarkers for PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer: Is PD-L1 Expression a GoodMarker for Patient Selection? / Y.K Chae, A. Pan, A.A. Davis et al. // *Clin. Lung Cancer.* – 2016. – Vol.17, №5. – P. 350-361.

50. Chen, C. Changes of CD4+CD25+FOXP3+ and CD8+CD28- regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery. / C. Chen, D. Chen, Y. Zhang et al. // *Int.Immunopharmacol.* – 2014. – Vol.18, №2. – P. 255-261.

51. Chen, T. Th9 Cell Differentiation and Its Dual Effects in Tumor Development. / T. Chen, J. Guo, Z. Cai et al. // *Front Immunol.* – 2020. – Vol.11.

52. Chernysheva, O. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. / O. Chernysheva, I. Markina, L. Demidov et al. // *Cells.* – 2019. –Vol.8, №6. – P. 188-196.

53. Costa, A. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. / A. Costa, Y. Kieffer, A. Scholer-Dahirel et al. // *Cancer Cell.* – 2018. – Vol.33, №3. – P.463-479.

54. Cote, RJ. Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. / RJ. Cote, EJ. Beattie, B. Chaiwun et al. // *Ann. Surg.* – 1995. – Vol.222, №4. – P. 415-425.

55. 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. // *Eur. J. Immunol.* – 2011. – Vol.41, №1. – P. 195-201.

56. Deleeuw, R.J. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. / R.J. Deleeuw, S.E. Kost, J.A. Kakal et al. // *Clin Cancer Res.* – 2012. – Vol.18, №11. – P. 3022-3029.

57. DeNardo, D.G. CD4+ cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. / D.G. DeNardo, J.B. Barreto, P. Andreu et al. // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol.16, №2. – P.91-102.

58. Deshpande, P. Cutting edge: CNS CD11c+ cells from mice with encephalomyelitis polarize Th17 cells and support CD25+CD4+ T cell-mediated immunosuppression, suggesting dual roles in the disease process. / P. Deshpande, I.L. King, B.M. Segal. // *J Immunol.* – 2007. – Vol.178, №11. – P. 6695-6699.

59. Dirat, B. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. / B. Dirat, L. Bochet, M. Dabek et al. // *Cancer Res.* – 2011. – Vol.71, №7. – P. 2455-2465.

60. Downey, R.G. Video-Assisted Thoracic Surgery for Lung Cancer Resection: A Consensus Statement of the International Society of Minimally Invasive Cardiothoracic Surgery (ISMICS) 2007. / R.G. Downey, D. Cheng, K. Kernstine et al. // *Innovations (Philadelphia).* – 2007. – Vol.2, №6. – P. 293-302.

61. Duan, MC. Disturbed Th17/Treg Balance in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. / MC. Duan, W. Han, PW. Jin et al. // *Inflammation.* – 2015. – Vol. 38, №6. 2156-2165.

62. Faye, R.S. Immunomagnetic Detection and Clinical Significance of micrometastatic tumor cells in malignant melanoma patients. / R.S. Faye, S. Aamdal, H.K. Hoifodt et. al. // *Clinical Cancer Research.* – 2004. – Vol.10, №12. – P. 4134-4139.

63. Ferlay J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al. // *Int. J Cancer.* –2015. – Vol.136, №5. – P. 359-386.

64. 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.

65. Filaci, G. CD8<sup>+</sup> 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.

66. Flatmark, K. Disseminated tumour cells as a prognostic biomarker in colorectal cancer. / K. Flatmark, E. Borgen, J.M. Nesland et al. // *British J. Cancer*. – 2011. – Vol.104, №9. – P. 1434-1439.

67. Forde, P.M. Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. / P.M. Forde, J.E. Chaft, K.N. Smith et al. // *New Engl. J Med*. – 2018. – Vol.378, №21. – P. 1976- 1986.

68. Fujita, Y. Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation. / Y. Fujita, K. Suda, H. Kimura et al.// *J Thoracic Oncol*. – 2012. – Vol.7, №11. – P. 1640- 1644.

69. Fukunaga, A. CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. / A. Fukunaga, M. Miyamoto, Y. Cho et al. // *Pancreas*. – 2004. – Vol.28, №1. – P. e26-31.

70. Gao, H. The BMP inhibitor Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites. / H. Gao, G. Chakraborty, A.P. Lee-Lim et al. // *Cell*. – 2012. –Vol.150, №4. – P. 764-779.

71. Garon, E.B. Five-year long-term overall survival for patients with advanced NSCLC treated with pembrolizumab: Results from KEYNOTE-001. / E.B. Garon, M.D. Hellmann, E.C. Costa et al. // *J Clin. Oncol*. – 2019. – Vol.37, №18.

72. Gentles, AJ. A human lung tumor microenvironment interactome identifies clinically relevant cell-type cross-talk. / AJ. Gentles, A.B. Hui, W. Feng et al. // *Genome Biol*. – 2020. – Vol.21, 107.

73. Gettinger, S.N. Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS 936558, ONO 4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. / S.N. Gettinger, L. Horn, L. Gandhi et al. // *J Clin. Oncol.* – 2015. – Vol.33, №18. – P. 2004-2012.

74. Giampieri, S. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. / S. Giampieri, C. Manning, S. Hooper, et al. // *Nat. Cell. Biol.* – 2009. – Vol.11, №11. – P. 1287-1296.

75. Giancotti, F.G. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. / F.G. Giancotti // *Cell.* – 2013. – Vol.155, №4. – P. 750-764.

76. Grzywa, TM. Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response. / TM. Grzywa, A. Sosnowska, P. Matryba et al. // *Front Immunol.* – 2020. – Vol.11, №938.

77. Guery, L. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. / L. Guery, S. Hugues // *Biomed Res. Int.* – 2015. – Vol.2015, ID314620.

78. Han, BK. The CD27- CD70 pathway and pathogenesis of autoimmune disease. / BK. Han, NJ. Olsen, A. Bottaro // *Seminars Arthritis Rheum.* – 2016. – Vol.45, №4. – P. 496-501.

79. Hargadon, KM. Tumor microenvironmental influences on dendritic cell and T cell function: A focus on clinically relevant immunologic and metabolic checkpoints. / KM. Hargadon // *Clin. Transl. Med.* – 2020. – Vol.10, №1. – P. 374-411.

80. Hemsén, A. Comparative evaluation of urokinase-type plasminogen activator receptor expression in primary breast carcinomas and on metastatic tumor cells. / A. Hemsén, L. Riethdorf, N. Brunner et al. // *Int. J Cancer.* – 2003. – Vol.107, №6. – P. 903-909.

81. Horn, L. EML4-ALK: Honing In on a New Target in Non-Small-Cell Lung. / L. Horn, W. Pao // *J Clin. Oncol.* – 2009. – Vol.27, №26. – P. 4232-4235.

82. Horn, L. Safety and clinical activity of atezolizumab monotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer: final results from a phase I study. / L. Horn, S.N. Gettinger, M.S. Gordon et al. // *Eur. Journal of Cancer.* – 2018. – Vol.101. – P. 201-209.

83. Hu, C. Energy metabolism manipulates the fate and function of tumour myeloid-derived suppressor cells. / C. Hu, B. Pang, G. Lin et al. // *British J Cancer*. – 2020. – Vol.122, №1. – P. 23-29.

84. Hu, X. Elevated Circulating CD4+CD25-Foxp3+ Regulatory T Cells in Patients with Nonsmall Cell Lung Cancer. / X. Hu, Y. Gu, S. Zhao et al. // *Cancer Biother. Radiopharm.* – 2019. – Vol.34, №5. – P. 325-333.

85. Hung, K. The central Role of CD4+ T cell in the antitumor immune response. / K. Hung, R. Hayashi, A. Lafond-Walker et al. // *J Exp. Med.* – 1998. – Vol.188, №12. – P. 2357-2368.

86. Janni, W. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. / W. Janni, B. Rack, C. Schindlbeck et al.// *Cancer*. – 2005. – Vol.103, №5. – P. 884-891.

87. Johnson, R.W. Induction of LIFR confers a dormancy phenotype in breast cancer cells disseminated to the bone marrow. / R.W. Johnson, E.C. Finger, M.M. Olcina et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2016. – Vol.18, №10. – P. 1078–1089.

88. Kaporis, HG. Human basal cell carcinoma is associated with Foxp3+ T cells in a Th2 dominant microenvironment. / HG. Kaporis, E. Guttman-Yassky, M A. Lowes et al. // *J Invest Dermatol.* – 2007. – Vol.127, №10. – P.2391-2398.

89. 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. // *Med. Oncol.* – 2010. – Vol.27, №1. – P. 29-33.

90. Kasimir-Bauer S. Evaluation of different markers in non-small cell lung cancer: prognostic value of clinical staging, tumour cell detection and tumour marker analysis for tumour progression and overall survival. /S. Kasimir-Bauer, N. Schleucher, R. Weber et al. // *Oncol. Rep.* – 2003. –Vol.10, №2. – P. 475-482.

91. Keunchil P. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomized controlled trial. /P. Keunchil, T. Eng-Huat, OB. Ken et al.// *Lancet Oncol.* – 2016. – Vol.17, №5. – P. 577-589.

92. Khalil, DN. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. / DN. Khalil, EL. Smith, RJ. Brentjens et al. // Nat. Rev. Clin. Oncol. – 2016. – Vol.13, №5.– P.273-290.

93. Kim, JH. Regulatory T Cells in Tumor Microenvironment and Approach for Anticancer Immunotherapy. / JH. Kim, BS. Kim, SK. Lee // Immune Netw. – 2020. – Vol.20, №1.

94. Klein, CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. / CA. Klein // Nat. Rev. Cancer. – 2009. – Vol.9, №4. – P. 302-312.

95. Klein, CA. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. / CA. Klein, S. Seidl, K. Petat-Dutter et al. // Nat. Biotechnol. – 2002. – Vol.20, №4. – P. 387-392.

96. Kobayashi, A. Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. / A. Kobayashi, H. Okuda, F. Xing et al. // J. Exp. Med. – 2011. –Vol.208, №13. – P. 2641-2655.

97. Kris, MG. et al. Identification of driver mutations in tumor specimens from 1000patients with lung adenocarcinoma: The NCI's lung cancer mutation consortium (LCMC). /MG. Kris, B.E. Johnson D.J. Kwiatkowski et al. // J Clin. Oncol. – 2011. – Vol.29. Abstract CRA7506.

98. Kufer, P. Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. /P. Kufer, A. Zippelius, R. Lutterbuse et al. // Cancer Res. – 2002. – Vol.62, №1. – P. 251-261.

99. Lee, DS. Clinical Responses and Prognostic Indicators of Concurrent Chemoradiation for Non-small Cell Lung Cancer. / DS. Lee, YS. Kim, JH. Kang et al. // Cancer Res. Treat. – 2011. –Vol.43, №1. – P. 32-41.

100. Leach, DR. Enhancement of antitumor immunity by CTLA 4 blockade. / DR. Leach, MF. Krummel, JP. Allison // Science. -1996. –Vol.22, №5256. – P. 1734-1736.

101. LeBleu, V.S. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. /V.S. LeBleu, R.Kalluri // Dis. Models Mech. – 2018. –Vol.11, №4.

102. Li R, Dubinett SM. Myeloid-derived suppressor cell-dependent inhibition of B cell responses in non-small cell lung cancer. / R. Li, SM. Dubinett // *Transl. Lung Cancer Res.* – 2019. – Vol.8, №4. – P. 331-333.

103. 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 Sci.* – 2018. – Vol.109, №12. – P. 3751-3761.

104. Lilleby, W. Disseminated tumor cells and their prognostic significance in nonmetastatic prostate cancer patients. / W. Lilleby, A. Stensvold, I.G. Mills et al. // *Int. J. Cancer.* – 2013. – Vol.133, №1. – P. 149-55.

105. 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.// *J Transl. Med.* – 2019. –Vol.17, №120.

106. 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. // *J Transl. Med.* – 2019. – Vol.17, №344.

107. 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.// *J.Cancer Cell Int.* – 2019. – Vol.19, №176.

108. Lu, L. Generation and regulation of CD8+ regulatory T cells. /Lu, L. Cantor H. // *Cell. Mol. Immunol.* – 2008. – Vol.5, №6. – P. 401-406.

109. Maemondo, M. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. /M. Maemondo, A. Inoue, K. Kobayashi et al. // *N. Engl. J Med.* – 2010. – Vol.362, №25. – P. 2380-2388.

110. Mahmoud, S.M. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. / S.M. Mahmoud, E.C. Paish, D.G. Powe et al. // *J Clin.Oncol.* – 2011. – Vol.29, №15. – P. 1949-1955.

111. Mahnke, Y.D. Who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. / Y.D. Mahnke, T.M. Brodie, F. Sallusto et al. // *Eur. J Immunol.* – 2013. – Vol.43, №11. – P. 2797-2809.

112. Mecklenburg, I. A multimarker real-time RT-PCR for MAGE-A gene expression allows sensitive detection and quantification of the minimal systemic tumor load in patients with localized cancer. / I. Mecklenburg, D. Weckermann, A. Zippelius et al. // *J Immunol. Methods.* – 2007. – Vol.323, №2. – P. 180-193.

113. Sieneł, W. Detection of MAGE-A Transcripts in Bone Marrow Is an Independent Prognostic Factor in Operable Non-Small-Cell Lung Cancer. / W. Sieneł, I. Mecklenburg, S. Dango et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol.13, №13. – P. 3840-3847.

114. Meloni, F. Foxp3 expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. / F. Meloni, M. Morosini, N. Solari et al. // *Hum. Immunol.* – 2006. – Vol.67, №1-2. – P. 1-12.

115. Mendoza-Reinoso, V. Contribution of Macrophages and T Cells in Skeletal Metastasis. / V. Mendoza-Reinoso, LK. McCauley, PGJ. Fournier et al. // *Cancers (Basel).* – 2020. – Vol.12, №4. 1014.

116. Meng, S. uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. / S. Meng, D. Tripathy, S. Shete et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2006. – Vol.103, №46. – P. 17361-17365.

117. Mitsudomi, T. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. / T. Mitsudomi, S. Morita, Y. Yatabe et al // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol.11, №2. – P. 121-128.

118. Mlecnik, B. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. / B. Mlecnik, M. Tosolini, A. Kirilovsky et al. // *J Clin. Oncol.* – 2011. – Vol.29, №6. – P. 610-618.

119. Mohme, M. Circulating and disseminated tumour cells - mechanisms of immune surveillance and escape. / M. Mohme, S. Riethdorf, K. Pantel // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol.14, №3. – P. 155-167.

120. Mok, TS. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. / TS. Mok, YL. Wu, MJ. Ahn et al. // *New Engl. J. Med.* – 2017. – Vol.376, №7. – P. 629-640.

121. Muller, V. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. / V. Muller, N. Stahmann, S. Riethdorf et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol.11, №10. – P. 3678-3685.

122. Ohgami, A. Micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with non-small cell lung cancer. / A. Ohgami, T. Mitsudomi, K. Sugio et al. // *Ann. Thorac Surg.* – 1997. – Vol.64. – P. 363-367.

123. Okazaki, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. / T. Okazaki, T. Honjo // *Int. Immunol.* – 2007. – Vol.19, №7. – P. 813-824.

124. Ota, K. Induction of PD-L1 Expression by the EML4-ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. / K. Ota, K. Azuma, A. Kawahara et al. // *Clin Cancer Res.* – 2015. – Vol.21, 317. – P. 4014-4021.

125. Ou, Sl. Alectinib in crizotinib-refractory ALK-rearranged non-small-cell lung cancer : a phase II global study. / Sl. Ou, JS. Ahn, LD. Petris et al. // *J Clin. Oncol.* – 2016. – Vol.34, №7. – P. 661-668.

126. Pantel, K. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. /K. Pantel, JR. Izbicki, M. Angstwurm et al. // *Cancer Res.* – 1993. – Vol.53, №5. – P.1027-1031.

127. Pantel, K. Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients. / K. Pantel, C. Alix-Panabieres // *Bonekey Rep.* – 2014. – Vol.3, №584.

128. Pantel, K. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. / K. Pantel, RH. Brakenhoff, B. Brandt // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – Vol.8, №5. – P. 329-340.

129. Pantel, K. Dissecting the metastatic cascade. / K. Pantel, RH. Brakenhoff // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – Vol.4, №6. – P. 448-456.

130. Pantel, K. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. / K. Pantel, J. Izbicki, B. Passlick et al. // *Lancet*. – 1996. – Vol.347, №9002. – P. 649-653.

131. Pantel, K. Differential expression of proliferation associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. / K. Pantel, G. Schlimok, S. Braun et al. // *J Natl. Cancer Inst.* – 1993. – Vol.85, №17. – P. 1419-1424.

132. Pantel, K. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. / K. Pantel, G. Schlimok, D. Kutter et al. // *Cancer Res.* – 1991. – Vol.51, №17. – P. 4712-4715.

133. Pantel, K. Immunocytological Detection of Bone Marrow Micrometastasis in Operable Non-Small Cell Lung Cancer. / K. Pantel, J. R. Izbicki, M. Angstwurm et al. // *CANCER RESEARCH*. – 1993. – Vol. 53, №5. – P. 1027-1031.

134. Park, HB. et al. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells. / HB. Park, DJ. Paik, E. Jang et al. // *Int. Immunol.* – 2004. – Vol.16, №8. – P. 1203-1213.

135. Passlick, B. Isolated tumor cells in bone marrow predict reduced survival in node-negative non-small cell lung cancer. / B. Passlick, B. Kubuschok, JR. Izbicki et al. // *Ann. Thorac Surg.* – 1999. – Vol.68. – P. 2053-2058.

136. Paz-Ares, L. KEYNOTE-407: phase 3 study of carboplatin-paclitaxel/nab-paclitaxel with or without pembrolizumab for patients with metastatic squamous NSCLC. / L. Paz-Ares, A. Luft, A. Tafreshi et al. // *J Clin. Onc.* – 2018. – Vol.36, №15.

137. Paz-Ares, L. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. / L. Paz-Ares, E-H. Tan, K. OByrne et al. // *Annals of Oncology* / – 2017. – Vol.28, №2. – P. 270-277.

138. Pein, M. Metastasis-initiating cells induce and exploit a fibroblast niche to fuel malignant colonization of the lungs. / M. Pein, J. Insua-Rodriguez, T. Hongu et al. // *Nature Comm.* – 2020. – Vol.11, №1.

139. Pennell, N.A. Understanding the Rationale for Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Semin Oncol.* / N.A. Pennell // – 2015. – Vol.42, №2. – P. 3-10.

140. Pfitzenmaier, J. Telomerase activity in disseminated prostate cancer cells. / J.Pfitzenmaier, WJ. Ellis, EW. Arfman et al. // BJU Int. – 2006. – Vol.97, №6. – P. 1309-1313.

141. Piccart-Gebhart, MJ. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. / MJ. Piccart-Gebhart, M. Procter, B. Leyland-Jones et al. // N Engl. J Med. – 2005. – Vol.353, №16. – P. 1659-1672.

142. Pierga, JY. Real-time quantitative PCR determination of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression of isolated micrometastatic cells from bone marrow of breast cancer patients. / JY. Pierga, C. Bonneton, H. Magdelenat et al. // Int J Cancer. – 2005. – Vol.114, №2. – P. 291-298.

143. Pishchik, V.G. Pervyj opyt vypolneniya torakoskopicheskikh lobehktomij s bronhoplastikoj. / V.G. Pishchik, E.I. Zinchenko, A.I. Kovalenco et.al. // Vestnik hirurgii imeni I. I. Grekova. – 2015. – Vol.174, №1. – P. 59-65.

144. Planchard, D. Dabrafenib Plus Trametinib in Patients With Previously Treated BRAF(V600E)-mutant Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: an Open-Label, Multicentre Phase 2 Trial. / D. Planchard, B. Besse, H.JM.Groen et.al. // Lancet Oncol. – 2016. – Vol.17, №7. – P. 984-993.

145. Price, T.T. Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone. T.T. Price, M.L. Burness, A. Sivan et. al. // Sci. Transl. Med. – 2016. – Vol.8, №340.

146. Reimers, N. Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells. / N. Reimers, K. Zafrakas, V. Assmann et al. // Clin. Cancer Res. – 2004. – Vol.10, №10. – P. 3422-3428.

147. Ribas, A. Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy. / A. Ribas // N Engl. J Med. – 2015. – Vol.373, №16. – P. 1490-1492.

148. Riethdorf, S. Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. / S. Riethdorf, H. Wikman, K.Pantel // Int. J Cancer. – 2008. – Vol.123, №9. – P. 1991-2006.

149. Riley, J.L. PD-1 signaling in primary T cells. / J.L. Riley // Immunol. Rev. – 2009. – Vol.229, №1. – P. 114-125.

150. Rosell, R. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced nonsmall-cell lung cancer patients with EGFR mutations. / R. Rosell, MA. Molina, C. Costa et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol.17, №5. – P. 1160-1168.

151. Rosell, R. EGFR compound mutants and survival on erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) in the EURTAC study. / R. Rosell, MA. Molina-Vila, M. Taron et al. // *J Clin. Oncol.* – 2012. – Vol.30, №15. – P. 7522.

152. Roychoudhuri, R. The interplay of effector and regulatory T cells in cancer. / R. Roychoudhuri, R.L. Eil, N.P. Restifo // *Curr. Opin Immunol.* – 2015. – Vol.33. – P. 101-111.

153. Rusch, VW. Neoadjuvant atezolizumab in resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): Initial results from a multicenter study (LCMC3). / VW. Rusch, JE. Chaft, B. Johnson et al. // *J Clin. Oncology.* – 2018. – Vol.36, №15. – P.8541.

154. Sai, B. Disseminated tumor cells in bone marrow are the source of cancer relapse after therapy. / B. Sai, J. Xiang // *J Cell Mol Med.* – 2018. – Vol.22. – P. 5776-5786.

155. Sarah, LB. The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy. / LB. Sarah, A. Rogel, A. Al-Shamkhani // – 2018. – Vol.131, №1. – P. 39-48.

156. Schoenfeld, A. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. / A. Schoenfeld, KH. Kruger, J. Gomm et al. // *Eur. J Cancer.* – 1997. – Vol.33. – P. 854-861.

157. Shaw, AT. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. / AT. Shaw, DW. Kim, R. Mehra et al. // *New Engl. J Med.* – 2014. – Vol.370. – P. 1189-1197.

158. Shaw, AT. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. / AT. Shaw, DW. Kim, K. Nakagawa et al. // *New Engl. J Med.* – 2013. – Vol.368, №25. – P. 2385-2394.

159. Steven, A. Invited review series: lung cancer practice, implementing evidence from around the world. Immunotherapy for lung cancer. / A. Steven, S.A. Fischer, B.W. Robinson // *Respirology*. – 2016. – Vol.21, №5. – P. 821-833.

160. Sekine, I. Induction systemic therapy followed by surgery for stages II-III non-small cell lung cancer: steady efforts. / I. Sekine, Y. Aida, H. Suzuki // *J Thorac Dis*. – 2018. – Vol.10, №33. – P. 3942-3945.

161. Socinsky, M.A. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC. / M.A. Socinsky, R.M. Jotte, F. Cappuzzo et al. // *N. Engl. J Med*. – 2018. – Vol.378. – P. 2288-2301.

162. 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. // *Clin. Cancer Res*. – 2003. – Vol.9, №1. – P. 174-80.

163. Solomayer, EF. Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. / EF. Solomayer, S. Becker, G. Pergola-Becker et al. // *Breast Cancer Res. Treat*. – 2006. – Vol.98. – P. 179-184 .

164. Sosa, M.S. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. / M.S. Sosa, P. Bragado, J.A. Aguirre-Ghiso // *Nat. rev. cancer*. – 2014. – Vol.14, №9. – P. 611-622.

165. Stankovic, B. Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer. / B. Stankovic, HK. Bjorhovde, R. Skarshaug et al. // *Front. Immunol*. – 2019. – Vol.9. A. 3101.

166. Sugio, K. Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and betacatenin: risk assessment by immunohistochemistry. / K. Sugio, S. Kase, T. Sakada et al. // *Surgery*. – 2002. – Vol.131, №1. – P. 226-231.

167. Sznol, M. Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7- H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. / M. Sznol, L. Chen // *Clin. Cancer Res*. – 2013. – Vol.19, №1. – P. 1021-1034.

168. Takeuchi, A. CD4 CTL a cytotoxic subset of CD4+ T-cells, their differentiation and function. / A. Takeuchi, T. Saito // *Front Immunol.* – 2017. – Vol.8, №194.
169. Tam, WL. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. / WL. Tam, RA. Weinberg // *Nat. Med.* – 2013. – Vol.19, №11. – P. 1438-1449.
170. Tanoue, L.T. New TNM classification for non small-cell lung cancer. / L.T. Tanoue, F.C. Detterbeck // *Expert review of anticancer therapy.* – 2009. – Vol.9, №4. – P. 413-423.
171. Terabe, M. Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity. / M. Terabe, JA. Berzofsky // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol.9. 1838.
172. Terabe, M. The role of NKT cells in tumor immunity. / M. Terabe, JA. Berzofsky // *Adv. Cancer Res.* – 2008. – Vol.101. – P. 277-348.
173. Thurm, H. Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy. / H. Thurm, S. Ebel, C. Kantenich et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol.9, №7. – P. 2598-2604.
174. Tony S. M. Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. / S.M. Tony, W. Yi-Long, Th. Sumitra et al. // *N. Engl. J Med.* – 2009. – Vol.361, №10. – P. 947- 957.
175. Tupitsyn, N.N. Bone marrow lymphocyte populations of innate immunity in breast cancer patients. / N.N. Tupitsyn, V.A. Mkrтчan, A.D. Palladina et al. // *Global J of medical res.* – 2020. – Vol.20, №2. – P. 20-27.
176. Ward-Hartstonge, KA. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response. / KA. Ward-Hartstonge, RA. Kemp // *Clin. Transl. Immunol.* – 2017. – Vol.6, №9. –P. 1-5.
177. Werther, K. Cytokeratin-positive cells in preoperative peripheral blood and bone marrow aspirates of patients with colorectal cancer. / K.Werther, M. Normark, N. Brunner et al. // *Scand. J Clin. Lab. Invest.* – 2002. – Vol.62, №1. – P. 49- 57.
178. Whiteside, T.L. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? / T.L. Whiteside // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2014. – Vol.63, №1. – P. 67-72.

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

180. Wiedswang, G. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. / G. Wiedswang, E. Borgen, R. Karesen et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – Vol.10, №16. 5342-5348.

181. Wyckoff, J.B. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. / J.B. Wyckoff, Y. Wang, E.Y. Lin et al. // *Cancer Res.* – 2007. – Vol.67, №6. – P. 2649-2656.

182. Wyckoff, JB. A critical step in metastasis; in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. / JB. Wyckoff, JG. Jones, JS. Condeelis et al. // *Cancer Res.* – 2000. – Vol.60, №9. – P. 2504-2511.

183. Xie, M. Inducers, Attractors and Modulators of CD4+ Treg Cells in Non-Small-Cell Lung Cancer. / M. Xie, J. Wei, J. Xu // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol.11, №676.

184. Yasumoto, K. Prognostic value of cytokeratin-positive cells in the bone marrow and lymph nodes of patients with resected non-small cell lung cancer: a multicenter prospective study. / K. Yasumoto, T. Osaki, Y. Watanabe et al. // *Ann. Thorac. Surg.* – 2003. – Vol.76, №1. – P. 194–201.

185. Ye, L. Circulating Tumor Cells Were Associated with the Number of T Lymphocyte Subsets and NK Cells in Peripheral Blood in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. / L. Ye, F. Zhang, H. Li et al. // *Dis. Markers*. – 2017. – P. 1-6.

186. Yilmaz, M. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. / M. Yilmaz, G. Christofori // *Cancer Metastasis Rev.* – 2009. – Vol.28, №1-2. – P. 15-33.

187. Zhang, J. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. / J. Zhang, C. Niu, L. Ye et al. // *Nature*. – 2003. – Vol.425. – P. 836-841.

188. Zhang, L. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. / L. Zhang, J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros et al. // *N. Engl. J Med.* – 2003. – Vol.348, №3. – P. 203-213.