

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

*На правах рукописи*

**МКРТЧЯН ВАНУИ АРТАКОВНА**

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

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

Доктор медицинских наук, профессор

**Воротников Игорь Константинович**

Доктор медицинских наук, профессор

**Тупицын Николай Николаевич**

**Москва – 2021 г.**

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
1.1 Современные представления о раке молочной железы .....	10
1.2 НК – клетки.....	13
1.3 В1 – лимфоциты .....	29
1.4 TCR- $\gamma\delta$ – лимфоциты .....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	49
2.1 Характеристика больных РМЖ .....	49
2.2 Методы исследования.....	61
2.3 Статистическая обработка.....	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	66
3.1 НК-клетки КМ больных РМЖ.....	66
3.2 Костномозговые популяции клеток врожденного иммунитета (TCR $\gamma\delta$ -клетки, В1-лимфоциты) больных РМЖ .....	74
3.3 Уровни клеток гранулоцитарного ростка в КМ больных РМЖ: клинико-морфологические и иммунологические параллели .....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	95
ВЫВОДЫ .....	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующее место в структуре злокачественных опухолей женской репродуктивной системы. Ежегодная смертность от РМЖ, по данным мировой статистики, составляет более 450 000 человек. Гетерогенность РМЖ определяет разнообразность клинического течения заболевания и обуславливает выбор тактики лечения, который подчас представляет собой весьма непростую задачу ввиду многообразия опций в терапии РМЖ [9]. Рациональный выбор тактики лечения больного во многом определяет его эффективность, которая также зависит от состояния иммунной системы пациента. По этой причине на сегодняшний день все больше внимания уделяется изучению противоопухолевого иммунного ответа, реализация которого происходит посредством как адаптивного, так и врожденного иммунитета.

В последние десятилетия фундаментальные исследования в области биологии РМЖ раскрыли ряд важных механизмов взаимодействия опухоли и иммунной системы больного, и появляется все больше доказательств о существенной роли системы врожденного иммунитета в реализации противоопухолевого иммунного ответа. Значительный интерес представляют клетки врожденного иммунитета. Они представлены НК-клетками, цитолитическая активность которых опосредована перфорином, гранзимами, рецепторами TRAIL, FasL [13, 14], а наличие CD16 обеспечивает реализацию антителозависимой клеточной цитотоксичности [224]; CD5+B1-лимфоцитами, продуцирующими естественные пентамерные антитела класса M, которые посредством связывания с опухоле-ассоциированными гликанами реализуют программу апоптоза опухолевых клеток, получившего название липоаптоз [12, 48, 206]; TCR $\gamma/\delta$ -лимфоцитами, которые обладают выраженным цитотоксическим потенциалом, быстро активируются и вовлекаются в процесс онкогенеза, способны обеспечивать элиминацию злокачественных клеток вне контекста молекул главного комплекса гистосовместимости 1-го и 2-го классов [29, 221]; миелоидными клетками (гранулоциты и моноциты), которые

продуцируют различные растворимые факторы, способны к миграции и могут вовлекаться другими эффекторными клетками в противоопухолевый ответ [102].

Клетки врожденного иммунитета широко изучаются как в периферической крови (ПК), так и в опухоли, при разных видах злокачественных новообразований, в том числе и при РМЖ. Это позволяет обнаружить механизмы врожденного иммунного ответа при раке и раскрыть их роль при проведении лечения химиотерапевтическими средствами, иммунопрепаратами, таргетными препаратами [208, 217]. Так, установлено, что значительные уровни субпопуляций НК-клеток в ПК у больных РМЖ коррелируют с полным лечебным патоморфозом [208]. Также обнаружена положительная взаимосвязь выраженной инфильтрации TCR $\gamma/\delta$ -лимфоцитов с успехом неоадьювантой терапии РМЖ [163]. Уровень супрессорных клеток миелоидного происхождения (СКМП) в ПК больных РМЖ также связан с непосредственными результатами лекарственного лечения. Так, у пациенток с HER2 - негативным подтипом РМЖ при проведении неоадьювантной химиотерапии полный лечебный патоморфоз регистрируется в случаях с меньшим исходным количеством СКМП в ПК. Интересна потенциальная возможность использования уровня моноцитов ПК в качестве прогностического фактора у больных РМЖ, что продемонстрировано в ряде исследований [218]. Не менее любопытным фактом оказалось влияние бисфосфонатов на активность и экспансию TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов, установленное при РМЖ, что породило идею об использовании TCR- $\gamma\delta$ -клеток как терапевтического агента [51, 240]. Таким образом, эти и многие другие исследования демонстрируют, что звено врожденного иммунитета при проведении терапии вовлекается в реализацию противоопухолевого эффекта, улучшая процессы активации и миграции в опухолевую ткань клеток-эффекторов, распознавания и элиминации ими злокачественных клеток [10, 56, 238].

Изучению клеток врожденного иммунитета в КМ посвящено мало работ. Известно исследование, которое выполнялось при саркомах у детей [4]. В данной работе показана важная роль субпопуляций Т-клеток, НК-клеток и TCR-клеток в процессах гематогенного метастазирования при рабдомиосаркоме (РМС).

Установлено диагностическое и прогностическое значение TCR $\gamma/\delta$ -лимфоцитов при распространенных стадиях РМС, которые характеризовались снижением их уровня содержания в КМ. Исследований, посвященных изучению врожденного звена иммунитета в КМ при РМЖ практически нет. Отдельные работы сообщают об изменении клеточного состава, соотношения субпопуляций эффекторных клеток в КМ [11].

Следует отметить, что КМ в значительной степени определяет характер взаимодействия опухоли и иммунной системы, поскольку в нем происходит созревание и генерация иммунокомпетентных клеток. При этом он является органом-мишенью для диссеминированных опухолевых клеток, которые часто обнаруживаются в КМ при РМЖ. Поэтому изучение клеток врожденного иммунитета в КМ больных РМЖ необходимо, так как может помочь глубже понять иммунные механизмы длительного персистирования диссеминированных опухолевых клеток в КМ больных данной категории, а также выявить новые подходы в разработке противоопухолевой терапии.

### **Цель исследования**

Изучение иммунофенотипических характеристик клеток врожденного иммунитета в КМ больных РМЖ и выявление их взаимосвязи с клинικο-морфологическими параметрами.

### **Задачи исследования**

1. Произвести количественную оценку CD5+B1-лимфоцитов в КМ больных РМЖ.
2. Охарактеризовать TCR  $\gamma/\delta$  - лимфоциты в КМ больных РМЖ.
3. Представить характеристику NK-клеток (CD16+, CD56+, CD3-) в КМ больных РМЖ.
4. Морфологическими и иммунологическими методами охарактеризовать моноцитарный и гранулоцитарный ростки гемопоэза в КМ больных РМЖ.

5. Провести детальный анализ полученных данных с патоморфологическими характеристиками РМЖ (гистологический вариант, рецепторный статус, Ki67, Her2/neu и т.д.)

6. Изучить взаимосвязь полученных данных с клиническими особенностями РМЖ (размер опухоли, стадия, pN и т.д.).

### **Научная новизна**

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

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

### **Теоретическая и практическая значимость**

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

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

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

### **Методы и методология исследования**

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

КМ для исследования получен методом стеральной пункции; информированное согласие каждого пациента, как с диагнозом РМЖ, так и с доброкачественными заболеваниями внесено в стационарную карту. Изучение КМ проведено на базе лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» с использованием двух методов: морфологического и иммунологического. Морфологическая оценка КМ выполнена с использованием световой микроскопии, которая проводилась двумя независимыми врачами-экспертами после окрашивания препаратов по методу Романовского. Осуществлен подсчет клеточных элементов и расчет индексов миелограммы.

Иммунологически КМ изучен методом многопараметровой проточной цитометрии с применением моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами. Учет реакции выполнен на проточном цитометре FACSCANTO II. Анализ полученных данных проведен с помощью программы FCS 3.

Для статистической обработки результатов выполненного исследования разработан специальный кодификатор и использовалось программное обеспечение SPSS, v.21. Оценку различий между количественными показателями вычисляли по критерию Стьюдента для нормально распределенных величин или

по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и  $\chi^2$ .

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

1. Существует отрицательная корреляционная связь между популяцией TCR  $\gamma/\delta$ -лимфоцитов КМ и индексом созревания эритроидных клеток при доброкачественных процессах, но не при РМЖ.

2. Уровень В1 лимфоцитов коррелирует с уровнем моноцитов при доброкачественных процессах, но не при РМЖ. Имеется выраженная корреляционная связь между костномозговыми В1-лимфоцитами и TCR  $\gamma/\delta$ -лимфоцитами при доброкачественных процессах, но не при РМЖ.

3. Уровни костномозговых В1-лимфоцитов достоверно коррелируют с эозинофильными миелоцитами и плазматическими клетками при раке молочной железы, но не при доброкачественных процессах в ней.

4. Средние уровни В1-лимфоцитов достоверно более высокие при нормальном или сниженном относительном содержании в КМ сегментоядерных нейтрофилов при РМЖ, но не при доброкачественных процессах в ней.

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

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

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

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

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

Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении достаточного объема клинического материала. В работе использованы современные методы исследования, полностью соответствующие поставленным задачам. Выводы аргументированы и вытекают из проведенных автором исследований. Практические рекомендации проверены в работе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Диссертация апробирована на научной конференции с участием отделений и лабораторий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и кафедры онкологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 24 марта 2020 года.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Современные представления о раке молочной железы

В настоящее время РМЖ – актуальная проблема современной онкологии. Он занимает ведущую позицию в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей среди женского населения [83, 86]. Благодаря последним достижениям молекулярной биологии стало известно, что РМЖ, является весьма гетерогенной опухолью и потому отличается разнообразным клиническим течением. Разнообразие клинического течения связано с наличием множества молекулярно-биологических факторов, определяющих широту морфологических и экспрессионных подтипов РМЖ. Определение подтипов РМЖ лежит в основе выбора вида лечения, которое подчас представляет собой весьма непростую задачу ввиду многообразия опций в терапии РМЖ.

На сегодняшний день известно несколько подтипов РМЖ. Одним из них является люминальный А подтип, составляющий около 30-45% и, по мнению большинства ученых, отличающийся благоприятным течением и хорошим ответом на лечение [56]. При данном подтипе РМЖ, как правило, опухоли небольших размеров с низкой пролиферативной активностью, высокой экспрессией стероидных рецепторов. Немалое количество BRCA2-ассоциированного РМЖ является люминальным А подтипом. Больным люминальным А РМЖ в большинстве случаев показано проведение в течение 5 лет адъювантной эндокринотерапии (тамоксифен и ингибиторы ароматазы), эффективность которой довольно высока. Как правило, в пременопаузе назначается либо один тамоксифен, либо подавление функции яичников плюс тамоксифен. При наличии противопоказаний к тамоксифену рекомендуется овариальная супрессия и в дальнейшем больной назначаются ингибиторы ароматазы. Также ингибиторы ароматазы показаны пациенткам постменопаузального периода, в особенности при метастатическом поражении лимфоузлов. Химиотерапия проводится таким больным при установленных метастазах в 4 и более подмышечных лимфоузлах.

Люминальный В РМЖ составляет почти 18% от всех подтипов РМЖ, отличаясь высокой частотой рецидивирования. Он характеризуется большими размерами первичной опухоли, частым метастазированием в лимфатические узлы, низкой экспрессией рецепторов стероидных гормонов, высокими пролиферативной активностью и степенью злокачественности. Представлен люминальный В РМЖ двумя вариантами: Her2-негативный (ER+, Her2-, Ki-67>30%, PR <20%) и Her2-позитивный (ER+, HER2+, Ki-67 любой, PR любые). Течение люминального В РМЖ более агрессивное, схожее с течением трижды негативного РМЖ. Люминальный В подтип имеет неблагоприятный прогноз, о чем свидетельствуют многочисленные исследования, в которых установлена достоверная корреляция между высокими уровнями индекса пролиферативной активности и низкой выживаемостью больных без признаков рецидивирования опухолевого процесса [53]. В отличие от люминального А подтипа РМЖ люминальный В подтип чувствителен к химиотерапии, которая является аналогичным подходом в терапии больных с трижды негативным РМЖ [54].

Последние научные исследования сообщают о том, что при HER-2/neu-негативном гормоноположительном РМЖ апробируется комбинация химиотерапии, анти-PD-L1 терапии и ингибитора PARP. Предполагается, что дефицит репарации ДНК в опухолевых клетках может привести к появлению иммуногенных антигенов в опухоли, активации пути STING и ингибированию пути PARP и усилению экспрессии PD-L1, что может обуславливать синергичное действие предлагаемой комбинации препаратов. Авторами получено значительное увеличение частоты полных патоморфологических ответов по сравнению с группой больных, получавших только химиотерапию [175].

При HER-2/neu-позитивном РМЖ (гиперэкспрессии онкопротеина Her2) предметом выбора являются моноклональные антитела (трастузумаб, лапатиниб и др.) в сочетании с химиотерапией [54]. Кроме того, по последним научным данным, применение таргетной терапии в комбинации с химиотерапией в неoadьювантном режиме при локализованном РМЖ позволяет достичь большей частоты полных патоморфологических ответов. Анти-HER-2 препараты могут

считаться иммуномодулирующими агентами ввиду их способности индуцировать антителозависимую цитотоксичность и влиять на активность эффекторных и антигенпредставляющих клеток [114, 192]. Кроме того, недавние исследования показали, что гибель иммунокомпетентных клеток на фоне химиотерапии (антрациклины, таксаны) приводит к разрушению иммуносупрессивного окружения опухоли [35, 135].

В исследовании Impassion 130 при трижды-негативном РМЖ показана эффективность анти-PD-L1 терапии в сочетании с химиотерапией набпаклитакселом [183]. Проводятся исследования анти-CTLA-4 терапии в комбинации с таргетными препаратами [17, 77].

Таким образом, современное лечение РМЖ во многом сопряжено с использованием иммунных механизмов противоопухолевого ответа, что позволяет добиваться большей эффективности проводимой терапии. Именно поэтому внимание исследователей сфокусировано на детальном изучении эффекторных звеньев иммунитета. Следует констатировать, что взгляд на проблему развернулся в сторону врожденного иммунитета, значимая роль которого сейчас активно обсуждается. Клетки врожденного иммунитета разнообразны по своему составу и свойствам. NK-клетки способны помимо цитолитической активности, к антителозависимой клеточной цитотоксичности [165, 224].

CD5+B1-лимфоциты продуцируют до 50% естественных антител класса M [205]. TCR $\gamma$ / $\delta$ -лимфоциты обладают выраженным цитотоксическим потенциалом и способны обеспечивать элиминацию опухолевых клеток вне контекста молекул МНС [177, 187].

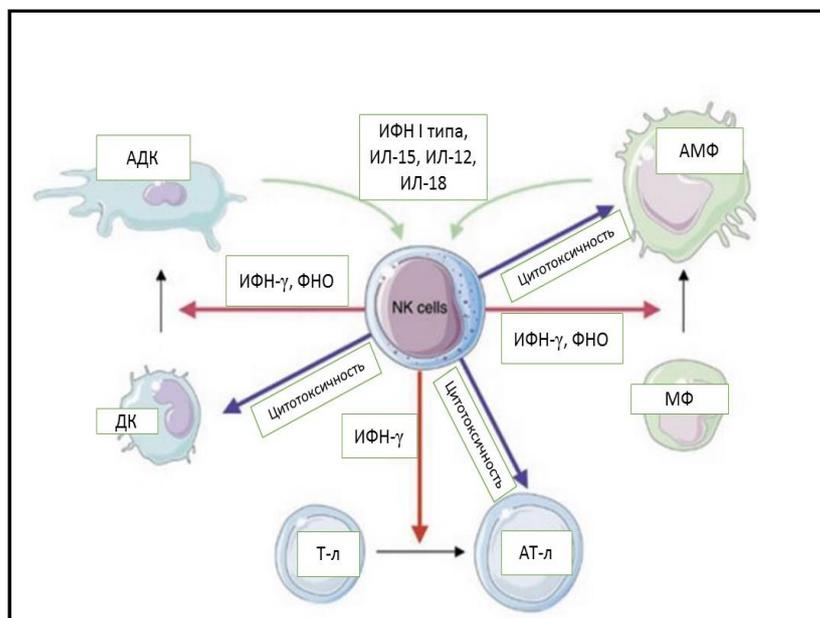
Миелоидные клетки (гранулоциты, моноциты) продуцируют различные растворимые факторы, способны к миграции, могут вовлекаться другими эффекторными клетками в противоопухолевый иммунный ответ [176, 238].

## 1.2 НК – клетки

Наиболее важными представителями системы врожденного иммунитета, пожалуй, следует считать НК-клетки, которые играют фундаментальную роль в противовирусной защите и противоопухолевом ответе. Реализация НК-клеточного иммунного ответа происходит в результате взаимодействия различных ингибирующих и активирующих рецепторов, ко-рецепторов с их лигандами на клетках-мишенях, а также посредством разнообразных растворимых факторов, продуцируемых НК-клетками. НК-клетки известны уже более 40 лет. Они относятся к быстрорастущему семейству врожденных лимфоидных клеток (ILC), которые в отличие от Т- и В-лимфоцитов не экспрессируют специфические рецепторы, кодируемые перестройкой генов [21, 61, 148, 214]. Локализуются НК-клетки преимущественно в селезенке, периферической крови и костном мозге. Недавние исследования установили, что НК-клетки присутствуют также в лимфатических узлах, тимусе, матке и печени [1, 90].

НК-клетки обладают способностью к быстрой миграции в воспаленные ткани или вторичные лимфоидные органы, где они играют защитную роль от патогенов, притерпевая окончательную дифференцировку. Некоторые НК-клетки могут оставаться жизнеспособными на протяжении нескольких месяцев, но в целом это короткоживущая популяция клеток [1].

Обнаружены НК-клетки благодаря их способности уничтожать опухолевые клетки вне контекста молекул ГКГ, без предшествующей сенсibilизации. Было отмечено, что они осуществляют иммунный противоопухолевый надзор и участвуют в предотвращении метастазирования опухолей. Активированные НК-клетки продуцируют разнообразный набор хемокинов и цитокинов, благодаря которым они могут успешно осуществлять не только цитолитическую активность, но и регулировать качество и силу адаптивных иммунных реакций [20, 84, 153] (Рисунок 1). Например, они участвуют в праймировании ответов Т-хелперных клеток (Th1).



**Рисунок 1** – Регуляция иммунных ответов НК-клетками: АДК- активированные дендритные клетки, ДК-дендритные клетки, Т-л-Т-лимфоциты, АТ-л- активированные Т лимфоциты, МФ-макрофаги, АМФ- активированные макрофаги [213]

В течение многих лет с момента их открытия, оставалось неясным, каким образом НК-клетки различают инфицированные вирусом или опухолевые клетки и нормальные клетки. Благодаря открытию HLA-I специфических ингибиторных рецепторов и множества активирующих рецепторов, экспрессируемых НК-клетками были уточнены молекулярные механизмы и пути их активации и инактивации [131]. Распознавание собственных молекул HLA-I специфическими ингибирующими рецепторами необходимо для предотвращения цитотоксического действия НК-клеток в отношении собственных клеток организма. Поскольку HLA-I тормозит активацию НК-клеток, утрата экспрессии этих молекул на поверхности клеток влечет за собой снижение порога активации НК-клеток, которая необходима для процесса распознавания опухоли.

НК-клетки происходят из гемопоэтических стволовых клеток КМ. Стадии их развития и созревания характеризуются последовательным приобретением или утратой рецепторных детерминант и функциональных свойств [79]. Некоторые стадии дифференцировки НК-клеток могут проходить в ПК: у пациентов,

перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Дифференцировка NK-клеток, подобно другим гемопоэтическим клеткам, индуцируется цитокинами, активацией факторов транскрипции и клеточными взаимодействиями.

Целый массив рецепторов, экспрессируемых NK-клетками, в последующем позволяет им осуществлять различные взаимодействия с предполагаемыми клетками-мишенями. Эти взаимодействия могут быть активирующими, регулируемыми или ингибирующими [132, 152]. К ингибирующим рецепторам относятся иммуноглобулин-подобные рецепторы, получившие сокращенное название KIR (Killer Ig-Like Receptors). Прототипы HLA-специфических рецепторов ингибирования были идентифицированы Moretta A. и соавторами [150, 151]. KIR относятся к супер-семейству иммуноглобулинов, экспрессируются популяцией NK-клеток ПК. Они распознают аллотипические детерминанты молекул HLA-C, общие для многих аллелей HLA-C. На сегодняшний день известны и охарактеризованы и другие рецепторы, обладающие свойством связывания различных групп аллелей HLA-I [171].

Другой HLA-I-специфический ингибиторный рецептор это CD94/NKG2A, он распознает HLA-E [59, 215]. CD94/NKG2A экспрессируется относительно рано во время созревания периферических NK-клеток, тогда как KIR появляются на более поздних стадиях. Однако совместная экспрессия CD94/NKG2A и KIR может наблюдаться в популяции созревающих NK-клеток. Biassoni R. И соавт. описали, что существуют активирующие формы KIR [34]. Активирующие KIR демонстрируют высокую степень гомологии последовательностей в своих внеклеточных доменах Ig с соответствующими ингибирующими KIR. Несмотря на это сходство, большинство активирующих KIR не обладают специфичностью связывания, аналогичной их ингибирующему аналогу. Пока это показано только для KIR2DS1.

Рецептор-опосредованное ингибирование NK-клеток представляет собой сложный механизм, позволяющий избежать уничтожения собственных здоровых клеток, который также подразумевает наличие «включенных» сигналов,

вызывающих активацию NK-клеток при взаимодействии с потенциальными клетками-мишенями [127]. Иными словами, активация зависит от баланса между активирующими и ингибирующими сигналами. S. Sivori et al. обнаружили поверхностный рецептор NKp46, способный индуцировать активацию NK-клеток, которая необходима для реализации цитотоксического действия в отношении опухолевых клеток [188]. В дальнейшем установлено, что на поверхности NK-клеток могут присутствовать и другие активирующие рецепторы: NKp44 и NKp30 [50, 170, 211]. Несмотря на некоторые молекулярные различия в своей структуре все эти рецепторы получили название «рецепторов естественной цитотоксичности». В большинстве случаев, для NK-опосредованного киллинга требуется вовлечение одного или нескольких рецепторов естественной цитотоксичности.

NKG2D относится к активирующему рецептору. Ряд других активирующих рецепторов, таких как 2B4, NTBА, DNAM-1, CD59 и NKp80, дополнительно выполняют функцию корецепторов, то есть они способны усиливать эффект рецепторов естественной цитотоксичности [156, 167]. Еще один вид рецепторов участвует в активации NK-клеток - Toll-подобные рецепторы (TLR), экспрессия которых после взаимодействия с бактериальными или вирусными патогенами и в присутствии провоспалительных цитокинов индуцирует NK-клетки [189]. Таким образом, активация NK-клеток зависит от вовлечения целого репертуара рецепторов. Сила активации NK-клеток отражает количество задействованных запускающих рецепторов и их плотность на поверхности клетки. Экспрессия лигандов или их отсутствие представляет собой еще одну важную контрольную точку для активации NK-клеток [156].

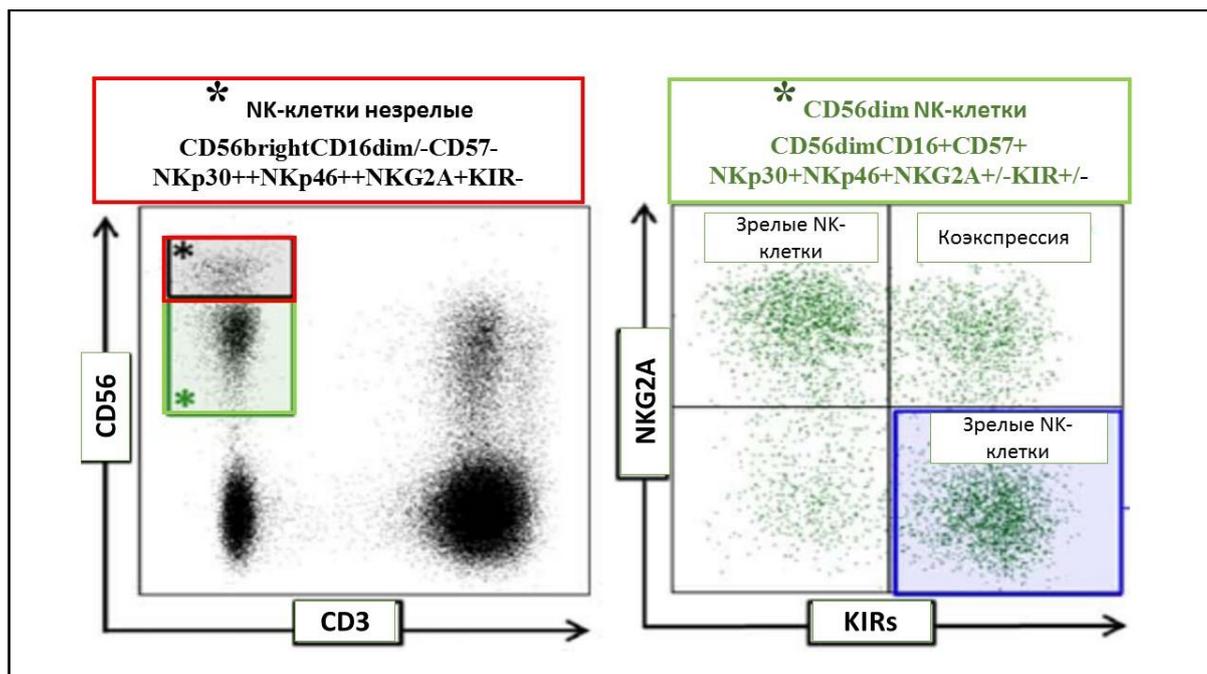
В зависимости от стадии созревания NK-клеток экспрессия рецепторных детерминант существенно различается. Определенные активирующие рецепторы, такие как HLA-E-специфический NKG2C, экспрессируются только на поздних стадиях созревания NK-клеток. Ряд других рецепторов, появляется также только на определенных стадиях дифференцировки или они экспрессируются определенными популяциями NK-клеток. Например, CCR7 экспрессируется NK-

клетками CD56bright, тогда как CXCR1, CD16 и KIR экспрессируются NK-клетками CD56dim. Другие маркеры, такие как 2B4, NTBА, CD2, DNAM-1, NKG2D, NKp80, не ограничиваются конкретной популяцией NK-клеток [79]. Наибольший интерес представляет CD16, рецептор Fc $\gamma$  с низким сродством. Он способен связываться с комплексами Ig G и опосредует антителозависимую клеточную цитотоксичность. Экспрессируется CD16 зрелыми KIR позитивным и цитолитическими NK-клетками.

В целом стадии дифференцировки NK-клеток, начиная с клетки предшественницы (CD56+CD94+/-NKG2A/C-KIR-) можно кратко охарактеризовать следующим образом. Слабая экспрессия CD56++ отражает этап дифференцировки, на котором NK-клетки пока не экспрессируют CD16: NKG2A+, NKG2C+/-, KIR-. Следующая стадия созревания характеризуется ослаблением CD56 и приобретением экспрессии CD16: NKG2A+NKG2C+/-KIR+/. Далее NK-клетками приобретает разнообразие KIR и утрачивается NKG2A; NKG2C+/-, KIR+. Дифференцировка завершается появлением адаптивных NKG2C++ клеток, CD16+, NKG2A-i KIR+. Этот этап соответствует клональной экспансии и выживанию NK-клеток [133].

В периферической крови NK-клетки составляют 10-15% от всех лимфоцитов и в большинстве своем состоят из зрелых клеток. При этом они довольно гетерогенны как по фенотипическим, так и по функциональным характеристикам. Фенотип их определяется на основании экспрессии поверхностной молекулы NCAM1 (CD56) и отсутствию экспрессии пан-T-клеточного маркера CD3 [154, 155]. На сегодняшний день идентифицированы и охарактеризованы две основные популяции NK-клеток ПК, которые отличаются выраженностью экспрессии CD56 и CD16 и выполняют различные иммунорегуляторные функции: CD56dimCD16+, CD56brightCD16- (Рисунок 2). CD56 может опосредовать взаимодействия между NK-клетками и клетками-мишенями, тогда как перекрестное связывание рецепторов CD16 отвечает за антителозависимую клеточную цитотоксичность, самый мощный способ инициировать опосредованный NK-клетками лизис [100, 125, 152].

Наибольшую пропорцию в ПК составляет популяция CD56dimCD16+ (90%). Эти клетки характеризуются слабой экспрессией CD56 и выраженной экспрессией антигена CD16 [60]. Минорная популяция CD56bright CD16- составляет примерно 5-10% NK-клеток ПК. Эти две популяции по-разному распределяются в тканях. В то время как CD56dim в значительной степени преобладают в ПК, CD56bright чаще встречаются в определенных тканях и вторичных лимфоидных органах.



**Рисунок 2** – Популяции NK-клеток на основании экспрессии антигенов CD56 и CD16 [239]

До недавнего времени считалось, что продукция цитокинов ограничивается клетками CD56bright, в то время как цитолитическую активность связывали с популяцией CD56dim. Однако было обнаружено, что цитолитические клетки CD56dim содержат большое количество мРНК для IFN- $\gamma$  и могут продуцировать высокие уровни цитокинов [68, 80].

На поверхности клеток популяции CD56dim отмечена высокая плотность экспрессии цитолитических гранул, содержащих перфорин и гранзимы, которые слабо экспрессируются популяцией клеток CD56bright. Последним для высвобождения цитокинов требуется более 16 часов. Это в первую очередь

является следствием активации клеток, индуцированной цитокинами. Функциональные различия между двумя популяциями НК-клеток связаны, по крайней мере, частично, с различной экспрессией рецепторов цитокинов (рецепторы IL-2, IL-15 и IL-7) и функциональных рецепторов НК-клеток. Экспериментальные данные свидетельствуют, что CD56bright представляют собой раннюю стадию созревания периферических НК-клеток с дальнейшей дифференцировкой до CD56dim-клеток. Паттерн экспрессии поверхностных молекул и генетическая программа CD56brightCD16 – НК-клеток позволяют им быстро пролиферировать, продуцировать высокие уровни хемокинов и провоспалительных цитокинов Th1, возвращаться во вторичные лимфоидные органы и взаимодействовать с другими клетками врожденного и адаптивного иммунитета [174, 201, 212]. Популяция CD56dim может экспрессировать KIR, отличается выраженным уровнем экспрессии молекул CD16 (FcγR) и CD57, отсутствием экспрессии CD94/NKG2A и характеризуется низкой пролиферативной способностью [37, 67]. Рецептор CD57 некоторыми авторами предлагается рассматривать как маркер завершения дифференцировки НК-клеток [132]. Благодаря выраженной экспрессии NKG2D, а также рецепторов естественной цитотоксичности, популяция CD56dim обладает выраженной противоопухолевой активностью [139]. CD56dim НК-клетки также обладают преимущественной способностью к хомингу в отношении участков воспаления. Интересно, что клетки CD56dim могут приобретать хемокиновые рецепторы CCR7 путем трогицитоза при взаимодействии с клетками CCR7+ (например, дендритными клетками) и способны мигрировать в лимфатические узлы [141, 142]. Есть убедительные доказательства того, что клетки CD56dim могут изменять свои фенотипические свойства и продолжать дифференцироваться на протяжении всей своей жизни [33, 36]. Установлено, что при определенных патологических состояниях может наступать экспансия дополнительных минорных субпопуляций НК-клеток: CD56-CD3-CD16+ популяции при ВИЧ-инфекции и при гепатите С, а также CD56dimCD16-, или CD56brightCD16+ популяции [96, 126, 143, 198, 231].

Однако остается много вопросов относительно развития и функциональной значимости этих субпопуляций *in vivo* [91, 92].

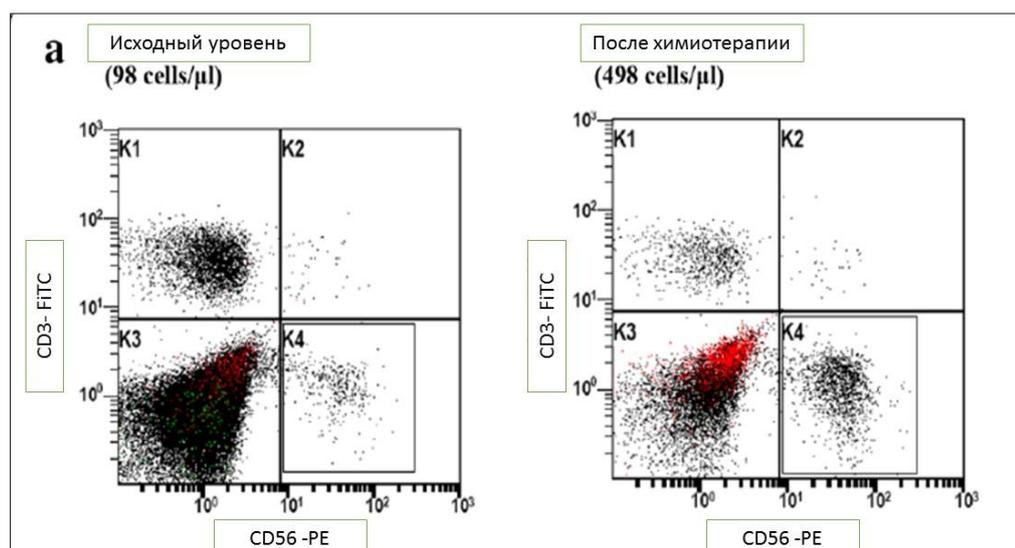
Изучение популяций НК-клеток при РМЖ проводится в ПК и в опухоли. Сообщается, что при РМЖ наблюдается как изменение пропорции популяции НК-клеток, так и нарушение их функции. Увеличение их содержания в ПК отмечается не только при местно-распространенном, но и при метастатическом РМЖ, хотя в ряде публикаций сообщается об отсутствии изменения уровня циркулирующих популяций НК-клеток [8, 191, 208].

Следует отметить, что даже если содержание циркулирующих НК-клеток находится в нормальных пределах, они отличаются сниженной способностью к цитотоксической активности и секреции провоспалительных цитокинов, которая по мере прогрессирования заболевания ухудшается [89, 114, 121, 137, 139, 165, 208]. Одновременно прогрессирование заболевания способствует дальнейшему подавлению экспрессии активирующих рецепторов (NKp30, NKG2D, DNAM1 и 2B4) и усилению экспрессии ингибиторных рецепторов (NKG2AиCD85j) [137, 165]. На распространенных стадиях опухоли НК-клетки демонстрируют сниженную чувствительность к цитокинам [75, 158].

Изменение пропорции субпопуляций циркулирующих НК-клеток происходит с увеличением количества цитокин-продуцирующих CD56bright CD16low\ - клеток и уменьшением цитотоксической популяции CD56dimCD16+ клеток [24, 93, 139]. Этот дисбаланс отрицательно влияет на пул доступных эффекторных клеток-киллеров, учитывая, что более высокая доля CD16+ НК-клеток, по-видимому, коррелирует с более эффективной антитело-зависимой цитотоксичностью [207]. Способность НК-клеток к антитело-зависимой клеточной цитотоксичности становится особенно важной в контексте HER2+ РМЖ, лечение которого проводится трастузумабом [179].

Для установления предикторов эффективности ответа на терапию трастузумабом проводилась оценка антитело-зависимой цитотоксичности НК-клеток при раннем и метастатическом РМЖ [39, 207]. В нескольких исследованиях установлено, что применение трастузумаба повышает

цитотоксичность NK-клеток [207], что коррелирует с более высокой выживаемостью без прогрессирования [28]. Не менее важные данные получены в отношении неoadьювантной химиотерапии РМЖ, на фоне которой наблюдается усиление экспрессии активирующих рецепторов и более высокая продукция цитотоксических гранул [208]. Это касается особенно схем, содержащих таксану [55]. В своем исследовании Verma Ch. и соавторы оценили общее содержание циркулирующих NK-клеток, их цитотоксические субпопуляции, а также уровень NK-клеток и цитокинов (IL-2, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ) в опухоли у больных местнораспространенным РМЖ [208]. Исходно установлено снижение абсолютного количества CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-клеток. При полном ответе на лечение (8 курсов химиотерапии) наблюдалось увеличение как абсолютного, так и процентного содержания популяции CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>, в том числе granzim/perforin<sup>+</sup> (Рисунок 3). Также в группе больных с полным патоморфологическим ответом на лечение выявлено значительное увеличение процента NK-NKG2D<sup>+</sup> клеток по сравнению с группой здоровых доноров. Обнаружена значимая корреляция между исходным уровнем перитуморальных инфильтрирующих CD56<sup>+</sup> клеток и последующей степенью ответа на лечение.



**Рисунок 3** – Пропорция популяции CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-клеток после лечения [208]

Другими авторами установлено, что пропорция циркулирующих НК-клеток более выражена при HER2-негативном РМЖ, что коррелирует с ответом на неoadвантную химиотерапию [160, 161].

Результаты вышеуказанных исследований подчеркивают потенциальную возможность использования цитотоксической функции НК-клеток в качестве маркера эффективного ответа опухоли на проводимое лекарственное лечение. Наравне с этим, следует обратить внимание, что определение цитотоксических популяций в ПК может быть полезно при проведении лучевой терапии РМЖ. В исследовании Isabel Linares-Galiana I. и соавт. обнаружили значительное увеличение пропорции субпопуляции НК-клеток CD56highCD16+ спустя 3 недели после интраоперационной радиотерапии (0,30–0,42%,  $p < 0,001$ ), которая проводилась группе больных РМЖ с низким риском рецидива [129]. CD56highCD16+ НК-клетки характеризуются экспрессией NKG2A и низким уровнем перфорина и в первую очередь специализируются на продукции цитокинов. В ПК эти НК-клетки экспрессируют CD62L, CCR7, CXCR4 и CXCR3, что делает возможным их преимущественное рекрутирование во вторичные лимфоидные органы, опухоль, воспаленные ткани. Одним из факторов, повлиявших на изменение процентного содержания этих клеток, может быть высвобождение цитокинов после облучения. Эти данные показывают, что однократная доза облучения может увеличить количество этих клеток, обладающих противоопухолевой способностью.

Широко изучается фенотипический профиль популяций НК-клеток, и его сопряженность с клиническим течением опухоли. Пропорция незрелых и цитотоксических НК-клеток может варьировать в зависимости от стадии опухолевого процесса, лекарственного лечения РМЖ [8, 46, 87]. Показано, что при РМЖ возникающие фенотипические и функциональные изменения НК-клеток периферической крови более выражены при прогрессировании опухоли. Обращает внимание, что эти изменения отражают процессы интратуморальных иммунных реакций, и обратно трансформируются при наступлении ремиссии [137, 138]. В этой связи хотелось бы более подробно остановиться на работе

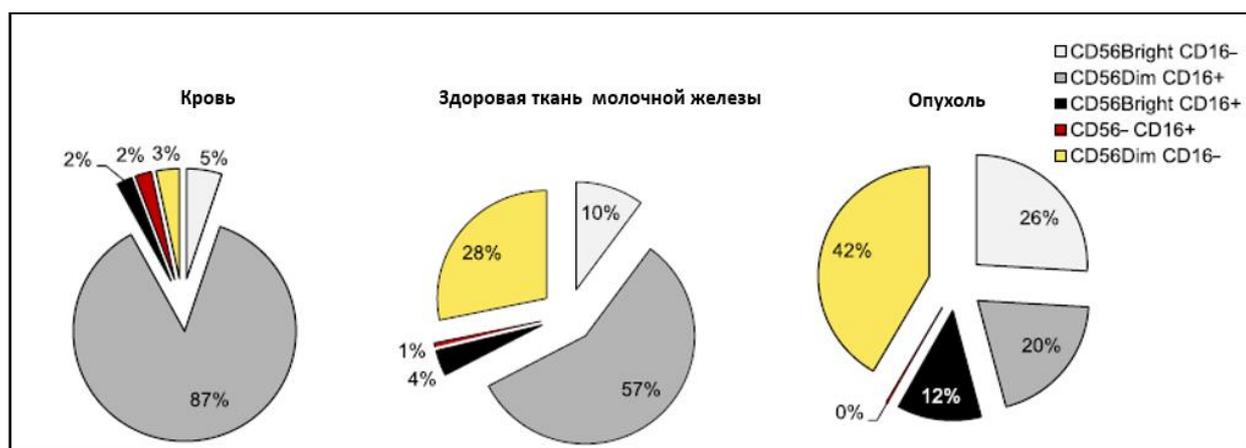
Mammessier E. и соавт. [139]. У больных инвазивным локализованным (pT1N0 и pT2N0, группа LOC), инвазивным местнораспространенным (от pT2N1–2 до pT4, группа LA), метастатическим РМЖ (группа М) и при доброкачественных опухолях (группа В) изучены популяции НК-клеток CD56dimCD16+, CD56dimCD16-, CD56brightCD16-, CD56brightCD16+ и CD56-CD16+, пропорции которых менялись в зависимости от распространенности заболевания. Это было особенно очевидно в группах LA и М (Рисунок 4).

Популяции НК-клеток	Группы больных				Достоверность различий между группами, p	
	В	LOC	LA	М		
CD56 <sup>Dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	87.3	83.5	76.9	70.1	Среднее (M)	
					B LOC	0.01
					B LA	0.001
					B M	0.0001
					LOC .. LA	0.001
					LOC .. M	0.0001
CD56 <sup>Bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5.8	6.1	9.4	11.2	LA M	ns
					B LOC	ns
					B LA	0.0001
					B M	0.0001
					LOC .. LA	0.0001
					LOC .. M	0.0001
CD56 <sup>Bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	2.1	4.2	5.5	6.6	LA M	ns
					B LOC	0.005
					B LA	0.0009
					B M	0.0003
					LOC .. LA	0.0095
					LOC .. M	ns
CD56 <sup>Dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	2.8	4.6	5.5	9	LA M	ns
					B LOC	0.0032
					B LA	0.0011
					B M	0.002
					LOC .. LA	0.0031
					LOC .. M	ns
CD56 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	2	1.9	2.7	3	LA M	ns
					B LOC	ns
					B LA	ns
					B M	ns
					LOC .. LA	ns
					LOC .. M	ns

**Рисунок 4** – Пропорции популяций НК-клеток в зависимости от распространенности РМЖ [139]

Авторы сообщают о том, что при изучении популяции НК были обнаружены CD56brightCD16+ и CD56dimCD16- клетки (незрелых, не цитотоксических популяций), пропорция которых была увеличена в ПК больных распространенным инвазивным РМЖ по сравнению с локализованными формами. Кроме того, установлено, что НК-клетки, выделенные из здоровых тканей МЖ, напоминают НК-клетки, активированные *in vitro*, которые, как известно,

обладают сильным противоопухолевым цитотоксическим потенциалом, что позволяет предположить, что они действительно продолжили свое созревание в популяции клеток-эффекторов по сравнению с большинством НК-клеток ПК. Интересно отметить, что микроокружение опухоли может ингибировать созревание НК-клеток, чтобы избежать цитотоксичности, опосредованной НК-клетками, и вызвать их толерантность [85]. Программа развития НК-клеток не полностью детерминирована, и зрелые НК-клетки могут повторно обучаться окружающей их средой [76, 118, 195]. Mammessier E. и соавторы описали, что инфильтрирующие опухоль НК-клетки не объединяются со здоровыми НК-клетками МЖ, а сгруппированы между CD56bright и более незрелыми популяциями НК-клеток. В основном это были субпопуляции CD56dimCD16- и CD56brightCD16-, составляющие почти 70% НК-клеток (Рисунок 5).



**Рисунок 5** – Пропорции популяций НК-клеток в периферической крови, в здоровой и опухолевой тканях молочной железы [139]

Авторами отмечено, что эти инфильтрирующие опухоль НК-клетки имели фенотип, который напоминает необученные клетки. Это скорее всего указывает на то, что опухолевое микроокружение может или реверсировать, или вызвать иную транскрипционную программу созревания НК-клеток для генерации ареактивных «самотолерантных НК-клеток» [119, 194]. Иными словами, клетки РМЖ приобретают способность менять механизм, необходимый для создания разнообразия репертуара НК-клеток, чтобы избежать противоопухолевого

иммунного ответа, переводя их в анергичное состояние [139]. Известно, что клетки рака могут подавлять поверхностную экспрессию рецептора естественной цитотоксичности NKp44 [73, 173]. Кроме того, опухолевые клетки могут индуцировать экспрессию ядерного антигена экзосомальных пролиферирующих клеток при физическом контакте с NKp44-экспрессирующими NK-клетками для подавления их эффекторной функции [180].

Еще одна работа представляет интерес. В своем исследовании Nieto-Velázquez N.G. и соавт. изучили популяции NK-клеток CD3-CD56dimCD16bright(CD56dim) и CD3-CD56brightCD16dim (CD56bright), а также оценили экспрессию рецепторов естественной цитотоксичности и NKG2D при РМЖ, доброкачественных процессах и в группе здоровых доноров [165]. Общее количество NK-клеток ПК CD56dim и CD56bright существенно не различалось между оцениваемыми группами. Авторами выявлены фенотипические изменения в рецепторах активации на CD56dim и CD56bright NK-клетках. При РМЖ клетки популяции CD56dim выразительно экспрессировали NKp44, а экспрессия NKp30, NKp46 и NKG2D была снижена в сравнении с группой здоровых доноров ( $p < 0,05$ ). При изучении популяции CD56bright установлено снижение экспрессии рецепторов NKp30, NKp46 и NKG2D при раке по сравнению с контрольной группой. Разница в экспрессии NKG2D рецептора популяциями CD56bright и CD56dim выявлена в отношении доброкачественных процессов и РМЖ. Таким образом, авторами обнаружены различия в экспрессии рецепторов естественной цитотоксичности и NKG2D популяциями CD56dim и CD56bright клеток. Это может указывать на приобретение NK-клетками иммунорегуляторного фенотипа, который объясняет низкие цитотоксические функции NK-клеток при РМЖ, о которых сообщалось Mamessier E. и другими исследователями [52, 137].

Большое количество исследований посвящено изучению прогностической роли NK-клеток. В метаанализе, выполненном китайскими учеными проанализировано прогностическое значение опухоль-инфильтрирующих NK-клеток при различных видах солидных опухолей. 56 независимых оригинальных исследований было подвергнуто тщательному изучению [234]. Следует сразу

обратить внимание, что в работах анализ НК-клеток в опухоли выполнен на основании одного маркера. В большинстве исследований использовался иммуногистохимический метод. В 18 исследованиях было представлено изучение экспрессии CD56, 31 исследование было посвящено анализу НК-клеточного маркера CD57, а в 7 исследованиях были представлены данные о прогностической ценности NKp46 маркера. Высокий уровень инфильтрации CD57+клетками коррелировал с улучшением общей и выживаемости без болезни. NKp46 в значительной степени связан с благоприятной общей и безрецидивной выживаемостью. В одном исследовании изучена прогностическая ценность маркера NKp30, выраженный уровень которого оказалось коррелировал с улучшением общей выживаемости при гепатоцеллюлярной карциноме. В отношении CD56 по результатам проведенного анализа установлено, что экспрессия данного НК-клеточного маркера может рассматриваться как независимый фактор прогноза лучшей общей выживаемости, в том числе при РМЖ.

В другой крупный мета-анализ было включено восемь исследований, посвященных изучению опухоль-инфильтрирующих НК-клеток РМЖ [162]. Всего изучено образцов: HER2 + 52 (n = 211), ER + 52 (n = 100), PR + 52 (n = 87) и трижды-негативного рака– 51 (n = 278). Четыре исследования показали, что более высокий уровень инфильтрации опухоли НК-клетками связан со значительным улучшением общей выживаемости [112, 202, 203, 216]. О значительном улучшении выживаемости без болезни сообщалось в исследовании Muntasell A., в котором оценивался уровень инфильтрации НК-клетками при HER2 позитивном молекулярном подтипе РМЖ [159]. Проведено лечение, включающее химиотерапию трастузумабом. Выявлена значимая связь степени инфильтрации опухоли НК-клетками с полным патоморфологическим ответом на терапию. Park M.H. и Vgenopoulou S. Не установили взаимосвязи между выживаемостью и выраженностью инфильтрации опухоли НК-клетками [168, 210]. В работе, представленной Rathore A.S. и соавторами низкий уровень инфильтрации CD56+НК-клетками обратно коррелировал со степенью злокачественности

опухоли, стадией и состоянием лимфоузлов, тогда как прямая корреляция отмечена с хорошим ответом на лечение и лучшей выживаемостью [178]. Недостатком работы является то, что для обнаружения НК-клеток использовался только один маркер. Противоречивые данные в представленных выше исследованиях могут быть обусловлены отсутствием информации о видах субпопуляций НК-клеток, инфильтрирующих опухоль, и их пропорции. Использование не только иммуногистохимического метода, но и метода проточной цитометрии, для оценки субпопуляций НК-клеток могло бы прояснить результаты и позволить провести их сравнение с работами других исследователей.

Интересное исследование представлено Ascierio M.L. и соавт., в котором анализировались образцы первичного РМЖ. Установлено, что молекулярные сигнатуры, связанные с активацией передачи сигналов НК-клетками взаимодействием НК-клеток с клетками-мишенями, представляют собой прогностический маркер безрецидивной выживаемости при РМЖ [22]. Garcia-Chagollan M. и соавторы указывают, что повышенная регуляция рецепторов GZMB, PRF1, NCR1, KIR и KLRC также связана с клиническим прогнозом болезни [95].

Изучению популяций НК-клеток КМ при солидных опухолях посвящено несколько исследований. Одним из интересных является изучение содержания НК-клеток при РМС у пациентов детского возраста [5]. В своей работе авторы показали, что при распространенных стадиях РМС по сравнению с локализованными опухолями уровни НК-клеток достоверно снижены. При наличии отдаленных метастазов среднее значение составило  $6,9 \pm 1,9\%$  против  $18,6 \pm 4,8\%$ . Полученные результаты, по мнению авторов, имеет важное практическое значение, поскольку это может отражать дефицит НК-клеточного звена при прогрессировании РМС. Кроме того, результатами, полученными в исследовании в отношении НК и CD8-клеток, авторы подтвердили, что прямого действия НК-клеток на опухоль недостаточно, для успешной элиминации требуется кооперация врожденного и адаптивного иммунного ответа.

В работе M. Feuerer и соавт. изучили популяции КМ у больных РМЖ и сопоставили их содержание с нормой. Оценивались НК-клеточные популяции на основании экспрессии маркера CD56. Уровни костномозговых НК-клеток оказались сниженными по сравнению с нормой [88].

E.F. Solomayer и соавт. выполнили сравнение субпопуляций КМ больных РМЖ после хирургического лечения и адъювантной химио, гормонотерапии. Пропорция НК-клеток оценивалась на основании маркеров CD56, CD45R0, CD3. Процент неактивированных НК-клеток CD56+CD45RA+ был увеличен. Содержание популяций клеток с цитотоксической активностью, таких как NKT-клетки (CD56+CD3+), активированные НК-клетки (CD56+CD45R0+) после адъювантной терапии было снижено продолжительный период времени [190].

Другие авторы изучали НК-клетки КМ при РМЖ, используя оценку экспрессии на лимфоцитах антигенов CD3 и CD16. НК-клеточная популяция идентифицировалась на основании отсутствия экспрессии лимфоцитами КМ CD3 и яркой экспрессии CD16: CD3–CD16+. Выполненный анализ позволил установить увеличение пропорции CD3–CD16+ клеток у больных РМЖ по сравнению с нормой. Средние значения уровня НК-клеток при РМЖ составили  $14,97 \pm 1,6\%$ , против  $8,9 \pm 2,2\%$  при доброкачественной патологии МЖ, однако различия не были статистически значимы [6].

Изучение КМ Janine E. и соавт. позволило установить, что резидентные НК-клетки отличаются от известных субпопуляций НК-клеток ПК (CD56bright и CD56dim) [144]. Различия касаются не только фенотипического, но и их транскрипционного профиля. Резидентные НК-клетки характеризуются выраженной экспрессией ингибирующих рецепторов TIGIT и CD96, слабой экспрессией DNAM1 и цитолитических молекул (GZMB, GZMH, GNLY). Их пролиферативная активность ниже по сравнению с циркулирующими НК-клетками [144].

Таким образом, НК-клетки являются довольно гетерогенной популяцией клеток, которые обеспечивая врожденный иммунный ответ, составляют первую линию противоопухолевой защиты. Они способны осуществлять цитолитическую

активность в отношении опухолевых клеток напрямую, без молекул ГКГ класса I. Кроме того, НК-клетки могут выделять множество растворимых противоопухолевых факторов. Их фенотип и функциональная активность разнообразны и могут меняться в зависимости от микроокружения опухоли, которая может переводить НК-клетки в анергичное состояние. Иными словами, действие НК-клеток на онкогенез двунаправленное, а их роль при различных видах рака до конца не ясна.

### 1.3 В1 – лимфоциты

В1-лимфоциты относительно небольшая группа В-клеток, обнаруживаемая у человека и мышей, являющаяся наиболее древней ветвью антителопродуцирующих клеток. Составляют В-1 лимфоциты около 5% от всей популяции В-клеток ПК. В1-лимфоциты появляются раньше других субпопуляций. На раннем этапе онтогенеза предшественники этих клеток мигрируют из кроветворной ткани (фетальной печени, оментума) в свою анатомическую нишу — в брюшную и плевральную полости, где автономно от центральных органов иммунной системы поддерживают численность своей популяции посредством очень медленной пролиферации [72,149]. 1-2% В1-лимфоцитов локализуются в селезенке и примерно 10% в серозных полостях [230]. На протяжении всей жизни В1-клетки постоянно циркулируют между селезенкой, получая информацию об антигенах, и брюшной полостью, но не поступают в фолликулы. Dorshkind K. et al. в своих исследованиях указывают, что пул В-1 лимфоцитов также может пополняться за счет костно-мозговых предшественников, хотя пока неизвестны стимулы, которые приводят к активации потенциальных предшественников В1-клеток [72].

Особенностью популяции В-1 лимфоцитов, впервые охарактеризованной Ли Херценбергом (Hayakawa et al.) как CD5+клетки, является не только анатомическая локализация и способность к самовосстановлению, но и осуществление ответа на патогены по тимуснезависимому пути [106]. Известны тимуснезависимые антигены двух типов (ТН1 и ТН2), которые могут вызывать поликлональную активацию В-лимфоцитов. ТН2 в ТН1 имеют преимущественно

небелковую природу, способны связывать несколько комплексов BCR благодаря особенности своей структуры, и таким образом приводить к активации В1-лимфоцитов без участия Т-клеток.

Репертуар рецепторов В1-лимфоцитов разнообразен и отражает их этапы развития. Значительная часть В1-лимфоцитов не имеет экспрессии TdT [81, 227]. Индукция TdT контролируется сигнальным путем  $IL-7\alpha$ , слабая экспрессия которого наблюдается на клеточной мембране фетальных В-клеточных предшественников  $IL-10+$  В1-лимфоцитов, и подавляется после экспрессии перестроенных  $\mu$ -тяжелых цепей комплекса BCR [111, 150]. Дальнейший онтогенез В1-лимфоцитов приводит к формированию субпопуляций В1а и В1б, которые отличаются друг от друга на основании экспрессируемых на мембране антигенов [99, 101, 230]. В1а-лимфоциты одновременно несут на своей поверхности молекулы CD5 и IgM. Рецептор IgD на мембране отсутствует или экспрессируется небольшим количеством В1-лимфоцитов. В литературе описывается, что для В1а-лимфоцитов характерен фенотип:  $CD19+CD21^{low}CD23-CD5+IgM++$ . В1б-клетки схожи с В1а-клетками, но они характеризуются отсутствием экспрессии на своей клеточной поверхности антигена CD5 [32], который исторически был идентифицирован как негативный регулятор передачи сигналов антиген - рецептор Т- и В-клетками. CD5 экспрессируется на клеточной поверхности зрелых Т-лимфоцитов. По данным экспериментальных исследований по изучению роли CD5 в регуляции роста В1-клеток, его экспрессия В1-лимфоцитами была связана с их неспособностью пролиферировать в ответ на стимуляцию IgM-BCR, в то время как экспрессия CD5 обычными В-клетками была связана с поддержанием анергического состояния [41, 108, 199]. По своей структуре CD5 является мономерным трансмембранным гликопротеином, который в комплексе с BCR участвует в распознавании и активации В1-лимфоцитов.

На поверхности В1-лимфоцитов возможна экспрессия молекулы  $\beta$ -2 интегрин CD11b. Она наблюдается на большинстве В1-лимфоцитов, локализующихся в серозных полостях. В экспериментальных работах

установлено, что экспрессия CD11b быстро утрачивается после того, как В1-лимфоциты покидают серозные полости тела и попадают в лимфоидные ткани. Небольшое количество клеток CD11b отрицательных В1-лимфоцитов в полостях тела указывает на их недавнее прибытие в это место [26]. Хотя тканеспецифические сигналы, которые индуцируют экспрессию CD11b на клетках В-1 в полостях тела, неизвестны, недавно показана одна из его функций: CD11b необходим для эффективного возвращения клеток В-1а из полостей тела в дренирующие лимфатические узлы [26].

В литературе описано, что на мембране В1-клеток отсутствует экспрессия рецепторов хемокинов [27]. Однако в своей работе Upadhye A. и соавт. установили, что возможны экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 на циркулирующих В1-лимфоцитах человека [205]. В1-клетки характеризуются «активированным фенотипом»: на клеточной мембране присутствуют костимулирующие молекулы CD80 и CD86, что позволяет В1-лимфоцитам выступать в роли антиген-презентирующих клеток [222].

Особенности рецепторного репертуара В1а-клеток обусловлены спектром бактериальных и аутоантигенов, что необходимо для поддержания быстрого иммунного ответа на инфекционные патогены и апоптотические клетки [25]. В1а-лимфоциты реализуют программу врожденного иммунитета, но могут также принимать участие в адаптивном иммунном ответе, хотя в большей степени это свойственно В1b-клеткам, которые отличаются от В1а-лимфоцитов разнообразием экспрессируемых рецепторов.

Еще одной отличительной особенностью В1-лимфоцитов является продукция естественных антител: IgM, IgG3 [182]. Антитела, синтезированные В1-лимфоцитами, не имеют значительного разнообразия вариабельных участков молекул иммуноглобулинов, ограничены в репертуаре распознаваемых антигенов. Они продуцируются активированными В-лимфоцитами как результат первичных иммунных реакций, протекающих в периферических лимфоидных органах. Продукция пентамерных антител класса М обеспечивается субпопуляцией В1а-клеток [58]. Они являются наиболее ранними в фило- и онтогенезе и

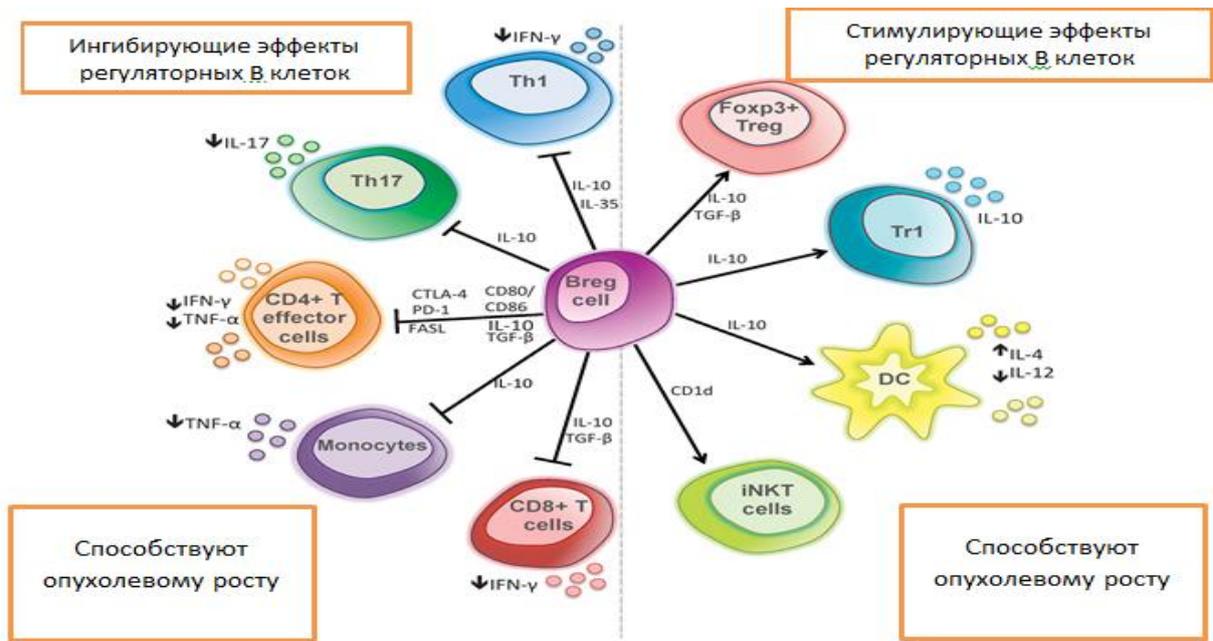
представляют собой полимер из 5 мономеров, связанных друг с другом ковалентными связями. Эти антитела составляют около 10% всех иммуноглобулинов. Отличительными их свойствами являются высокая степень агглютинации и опсонизации, полиреактивность на бактериальные антигены липополисахаридной структуры. Полиспецифичность естественных IgM приводит к их взаимодействию с аутоантигенами (ДНК, белки цитоскелета, фосфолипиды и др.), результатом чего являются аутоиммунные процессы и лимфопролиферативные заболевания [222]. В1а-клетками секретируется не менее половины сывороточного иммуноглобулинов класса М, которые посредством связывания с опухоле-ассоциированными гликанами реализуют программу апоптоза опухолевых клеток, получившего название липоаптоз [12, 48, 206].

Многочисленные исследования способности субпопуляций В1-лимфоцитов продуцировать IgM, выявило ряд интересных особенностей. Продукция естественных антител В1а-лимфоцитами отличается в зависимости от их локализации. В1-клетки, локализующиеся в перитонеальной полости конститутивно секретируют небольшое количество IgM, тогда как В1-лимфоциты, локализующиеся в КМ и селезенке, продуцируют большее количество антител и вносят значительный вклад в суммарные титры сывороточного IgM [58, 109, 110]. Наравне с этим установлено, что репертуар IgM, продуцируемых В1а-лимфоцитами КМ, является уникальным и более гетерогенным по сравнению с В1а-лимфоцитами перитонеальной полости, где В1-лимфоциты обнаружены в избытке, но продукция ими антител IgM довольно низкая [205]. Еще один интересный факт обнаружен в недавней работе Uradhуe А. и соавт., которые установили, что посредством экспрессии хемокинового рецепторов CXCR4 регулируется количество В1а-лимфоцитов в КМ. Оказалось, что экспрессия CXCR4 поддерживает миграцию В1а-лимфоцитов из перитонеальной полости в КМ, таким образом способствуя продукции IgM в КМ [205]. Отсутствие хемокинового рецептора CXCR4 снижает количество В1а-лимфоцитов и продукцию IgM, особенно в КМ. Другие авторы по результатам

своей работы также сообщают, что В1-лимфоциты в КМ продуцируют значительное количество естественных IgM [58].

Считается, что процессы «усовершенствования» гуморального иммунного ответа в виде переключения изотипов иммуноглобулинов с IgA на IgM и повышения сродства к антигенам, не затрагивают или минимально затрагивают В1-лимфоциты [49]. Имеются данные, что в слизистой кишечника высокое содержание IgA обеспечивается В1-лимфоцитами, что свидетельствует о переключении изотипа IgM на изотип IgA. Процессы переключения с IgM на другие изотипы поддерживаются ферментом AID, который обеспечивает конверсию генов и их рекомбинацию. Установлено, что индукции AID в В1-лимфоцитах способствует NF-κB, который также стимулирует синтез интерлейкинов (IL2, IL4) Т-лимфоцитами. При активации рецептора IL4 происходит индукция JAK1, который совместно с JAK3, как известно, обеспечивает фосфорилирование STAT6 и STAT5A. Это вызывает активацию AID и RAG-полимеразы, что приводит к рекомбинации V-генов иммуноглобулинов [2].

Еще одно событие обратило внимание на минорную супопуляцию В1-лимфоцитов, значение которой долго недооценивалось. Показано, что В1-лимфоциты могут влиять на иммунный ответ путем продукции цитокинов [185]. Считается, что субпопуляции В1-лимфоцитов серозных полостей конститутивно экспрессируют IL-10, что может придавать им регуляторные функции [166] (Рисунок 6). Все ли В1а-клетки могут реагировать на воспалительные сигналы продукцией цитокинов неизвестно. Так, Yanaba K. и соавт. в эксперименте на мышинной модели показали, что продукция IL-10 ограничивается в основном субпопуляцией CD1dhiCD5+, которая составляет примерно 1-3% В-клеток селезенки [146, 226]. Субпопуляция В1-лимфоцитов, продуцирующая IL-10, получила название В10-клетки. Сообщается, что продуцирующие IL-10 CD1d highCD5+ В лимфоциты могут способствовать опухолевому росту, подавляя фагоцитарную способность макрофагов/моноцитов как *in vivo*, так и *in vitro* [145, 146].



**Рисунок 6** – Функциональные механизмы В-регуляторных клеток [181]

Интересные данные накоплены в ходе изучения субпопуляции IL-10 продуцирующих В1-клеток человека. Опубликованы работы, которые сообщают, что эти клетки, обнаруженные в популяции В-клеток памяти CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>PK</sup> человека, подавляют пролиферацию моноцитов и продукцию цитокинов, что также отмечалось и в экспериментальных работах [116]. Другие авторы идентифицировали продуцирующие IL-10 В-1 лимфоциты в популяции CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>В-клеток, фенотип которых характерен для незрелых, переходных форм [38]. Предполагается, что ингибирующая активность CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> субпопуляции зависит от продукции IL-10, CD80-CD86 опосредованного клеточного контакта и, возможно, экспрессии PD-L1 [181].

Результаты исследования относительного содержания данной субпопуляции среди лимфоцитов ПК позволили выявить ее взаимосвязь с клиническим течением злокачественных опухолей. При исследовании IL-10-продуцирующих CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>лимфоцитов у больных раком пищевода установлено, что повышенное содержание этой популяции коррелировало с прогрессированием опухоли: более высокие ее уровни наблюдались в ПК больных с III /IV стадией по сравнению с ранними стадиями опухоли [232]. Также авторами сообщается, что данная субпопуляция может участвовать в подавлении

противоопухолевого иммунитета у человека через активацию транскрипционного фактора STAT3, который оказывает влияние на продукцию IL-10 [232]. Две группы ученых Liu J. и соавт. и Zhou X. и соавт. в своих исследованиях выявили положительную корреляцию повышенного уровня IL-10-продуцирующих В-лимфоцитов ПК с популяцией CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Tregs- клеток и CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low</sup>-миелоидных клеток-супрессоров, что сопровождалось прогрессией опухоли и снижением выживаемости больных [130, 236].

При раке яичников описано повышение уровня наивных IL-10-продуцирующих В-клеток или IgM<sup>+</sup> клеток памяти, которое коррелирует с более высокими уровнями FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Tregs-клеток и сниженной продукцией IFN- $\gamma$  CD8<sup>+</sup>Т-клетками [219]. Wang W. и соавт. показали преобладание субпопуляции CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> IL-10<sup>+</sup> в ПК больных раком желудка по сравнению со здоровыми донорами. Кроме того, авторы сообщают о положительной связи между высокими уровнями CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> и Treg-клеток. При этом ими отмечено снижение продукции цитокинов CD4<sup>+</sup>Т-клетками и индуцирование дифференцировки Treg-клеток *ex vivo* [216].

Изучение субпопуляционного состава В1-лимфоцитов ПК при раке желудка обнаружило наличие выраженной пропорции В1а-лимфоцитов, которая имела «активированный фенотип», что проявлялось в экспрессии на их поверхности активационных антигенов CD38 и CD25 [15]. В данной работе установлено, что у 23 % больных раком желудка в ПК количество В1а-лимфоцитов превышало норму в два раза. Более того, у 3 больных наблюдалось более 40% CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>-лимфоцитов. Изучение субпопуляции В1а-лимфоцитов у группы больных раком желудка, у которых наблюдалось их более 15% выявило выраженную экспрессию CD25<sup>+</sup> и CD21<sup>+</sup> антигенов, CD38<sup>+</sup>клеток при сравнении с группой, где количество В1а - лимфоцитов составляло менее 15%.

Tsuda В. и соавт. провели исследование субпопуляций В-лимфоцитов ПК больных РМЖ, включая CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> В1-лимфоциты, на которых установлена экспрессия антигена CD38 [204]. Согласно полученным данным, CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> лимфоциты на своей поверхности экспрессировали

CD24 и CD21, что соответствовало фенотипу переходных В-клеток Т1 и Т3. Отмечено, что у больных РМЖ по сравнению со здоровыми донорами значительно были повышены уровни В-клеток памяти (5,6% против 3,2%,  $p=0,003$ ) в группе больных, у которых общее количество В-клеток было выше (12,1% против 8,9%,  $p=0,024$ ). Оценивая полученные результаты, авторы сообщают, что была возможность включения продуцирующих IL10 В1-лимфоцитов в эту фракцию клеток. Данная субпопуляция, как известно, характеризуется фенотипом CD19+CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> и ингибирующими свойствами, авторы не исключают, что в данном анализе они оказались среди В-клеток памяти [38].

Немало исследований посвящено изучению В1-лимфоцитов в воспалительном инфильтрате опухоли. Накопление в ней IL-10+ В1-лимфоцитов с регуляторными свойствами сопровождается нарушением противоопухолевого иммунного ответа и более агрессивным поведением опухоли. Увеличение пропорции CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Tregs, как результат влияния IL-10-лимфоцитов, снижение выживаемости больных показано при различных видах рака и в том числе при РМЖ [147, 184, 237].

Таким образом, субпопуляция В1-лимфоцитов характеризуется разнообразием рецепторного репертуара, особенностями анатомической локализации, что отражает их функциональную гетерогенность, способность реализовывать реакции врожденного иммунитета, а также оказывать регуляторное воздействие на другие популяции лимфоцитов. Показано, что характер инфильтрации опухоли В1-лимфоцитами и содержание этих клеток в ПК могут иметь прогностическое значение при разных типах рака. Прогрессирование опухолевого процесса сопровождается повышением содержания данной субпопуляции в ПК.

#### **1.4 TCR- $\gamma\delta$ – лимфоциты**

TCR- $\gamma\delta$ -лимфоциты минорная гетерогенная субпопуляция, отличающаяся высоким полиморфизмом благодаря тому, что переменные домены TCR- $\gamma\delta$  кодируются не менее чем 9 генами. TCR- $\gamma\delta$  -лимфоциты составляют 0,5-16%

клеток CD3<sup>+</sup> в крови и лимфоидных тканях и 10-30% в слизистых кишечника. Для данной субпопуляции характерны способность распознавать опухолевые антигены без комплекса МНС, выполнение функций клеток как врожденного, так и приобретенного иммунитета, а также способность влиять на рост и распространение опухоли через иммуносупрессивные эффекты [123]. Их именуют также двойные отрицательные Т-клетки, поскольку они не экспрессируют антигены CD4, CD8. Т-клеточный рецептор данных клеток состоит из двух  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей [45, 74]. Локализуются TCR- $\gamma\delta$ -лимфоциты в селезенке, лимфатических узлах, печени, эпителии.

Онтогенез TCR- $\gamma\delta$ -лимфоцитов осуществляется в тимусе, костном мозге, печени эмбриона, слизистых оболочках [169]. Тимусзависимый путь развития характерен преимущественно для циркулирующих TCR- $\gamma\delta$ -лимфоцитов, а тимуснезависимый для резидентных клеток, которые отличаются потенциалом для дальнейшей активации, высоким уровнем экспрессии гранзимов, активационного антигена CD69, СС-хемокина RANTES, FasL, обеспечивающего FasL-зависимый килинг [40, 99].

Существует множество различных подтипов TCR- $\gamma\delta$ -лимфоцитов с различными фенотипическими и функциональными свойствами, но основными считаются V $\delta$ 2<sup>+</sup>, V $\delta$ 1<sup>+</sup>, V $\delta$ 3<sup>+</sup>Т лимфоциты [123]. При этом среди них есть и другие специфичные субпопуляции. Например, субпопуляции V $\delta$ 2<sup>+</sup>лимфоциты можно разделить на V $\gamma$ 9<sup>+</sup>V $\delta$ 2<sup>+</sup> врожденно-подобные и V $\gamma$ 9<sup>-</sup>V $\delta$ 2<sup>+</sup>адаптивные клетки. Субпопуляции V $\delta$ 1<sup>+</sup> и V $\delta$ 3<sup>+</sup>Т лимфоцитов, обнаруженных в ткани печени отличаются от тех, что циркулируют в крови [64, 115].

Циркулирующие TCR- $\gamma\delta$  (V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup>TCR) составляют не более 10% от мононуклеаров ПК, имея активированный фенотип или фенотип клеток памяти, которые способны к пролиферации, миграции и обладают цитотоксической активностью. В зависимости от степени дифференцировки клетки памяти могут экспрессировать костимуляторные молекулы CD27 или CD28, хемокины CXCR3, CXCR4, CCR5. Последние обеспечивают хоуминг-эффект циркулирующих V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> Т-клеток.

Резидентные TCR- $\gamma\delta$  (V $\delta$ 1+TCR, V $\delta$ 3+TCR) являются наивными, локализуются преимущественно в слизистых оболочках, выполняя цитотоксическую и иммунорегуляторную функции. Они экспрессируют хемокиновый рецептор CXCR9 и мигрируют в ответ на CCL25/TECK в процессе хоуминг-эффекта в слизистых. Посредством CCL25 регулируется функция интегринов, обеспечивающих адгезию резидентных TCR- $\gamma\delta$ -лимфоцитов.

Антигены, распознаваемые TCR- $\gamma\delta$ -лимфоцитами, это непептидные соединения, к которым относятся фосфоантигены и индуцибельные антигены. Одним из фосфоантигенов, обладающих выраженным агонистическим действием, является HMB-PP, продуцируемый МЕР-путем [44]. Распознавание этих молекул является ключом к осуществлению противоопухолевого, антибактериального иммунного ответа [120]. Индуцибельно-экспрессируемые антигены, которые появляются на поверхности клеток в результате воспаления, трансформации, представлены молекулами CD1, MICA, MICB, ULBP, TL, митохондриальными антигенами [140].

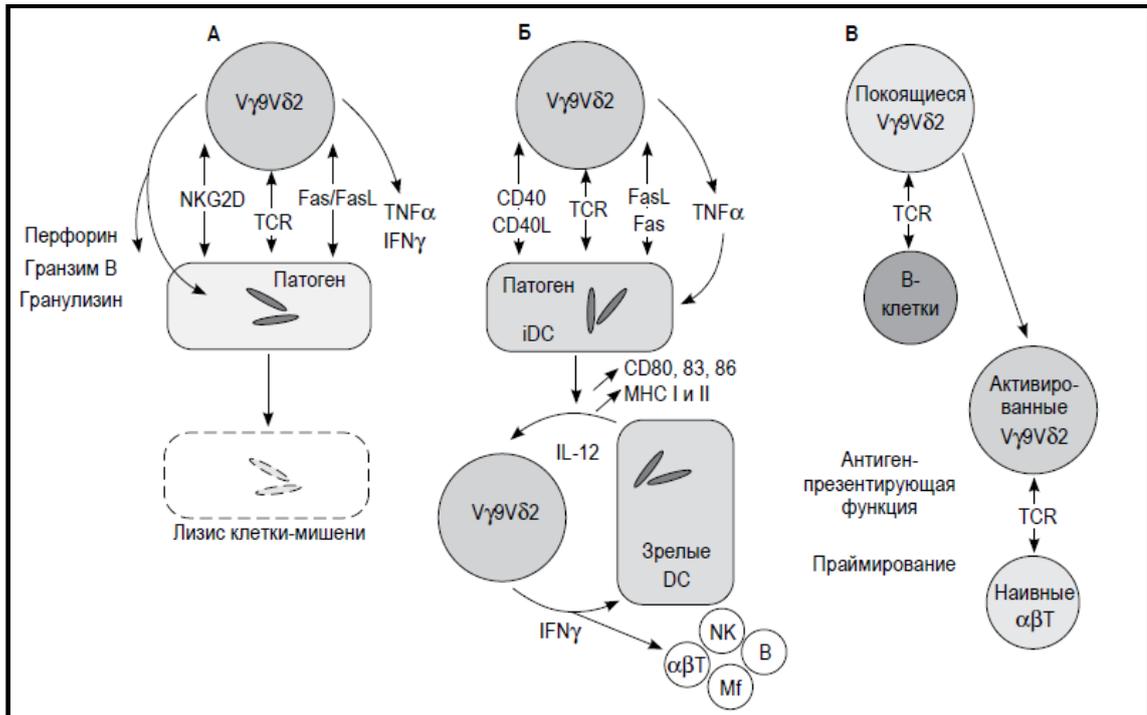
Активация TCR- $\gamma\delta$ -лимфоцитов происходит при помощи нескольких путей: посредством TCR-рецептора, молекул адгезии LFA1/ICAM1, рецепторов NK клеток [16]. Антигензависимые фенотипические изменения TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов схожи с изменениями CD8+ $\alpha\beta$ T-клеток. На их поверхности начинается экспрессия молекул CD45RO, характерных для  $\alpha\beta$ T-клеток центральной памяти, и CD45RA, имеющих на  $\alpha\beta$ T-клетках эффекторной памяти, а также утрачиваются ко-стимуляторные молекулы CD27, CD28.

TCR- $\gamma\delta$  лимфоциты также могут экспрессировать Toll-like reseptor, которые способствуют трансформации TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов в антиген-представляющие клетки [196]. Экспрессируемый на клеточной поверхности рецептор NK-клеток NKG2D способствует процессу распознавания трансформированных клеток, что происходит благодаря повышению экспрессии на поверхности TCR- $\gamma\delta$ -клеток молекул CD69 и CD25, как результата связывания NKG2D [223] с соответствующими лигандами (MICA, MICB, ULBP1-4) на трансформированных клетках. При этом TCR- $\gamma\delta$ -клетки начинают продуцировать TNF $\alpha$  и

увеличивается их цитотоксичность [157]. Известно, что TCR- $\gamma\delta$  также могут экспрессировать и другие активирующие/ингибирующие рецепторы NK -клеток CD94/NKG2A, CD94/NKG2C [16, 44, 62]. Активированные V $\gamma$ 9V $\delta$ 2+T-лимфоциты экспрессируют TRAIL, что обеспечивает TRAIL-индуцированный апоптоз [18, 44].

Разнообразие антигенных рецепторов, особенности микроокружения, различные пути активации TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов и этапы иммунного ответа обуславливают широкий спектр функций субпопуляции TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов (Рисунок 7). Они способны осуществлять презентацию антигенов, оказывать регуляторное воздействие на  $\alpha\beta$  T-клетки, участвовать в гуморальном иммунном ответе, проявлять цитотоксичность наравне с киллерными клетками. Антигенпрезентирующая функция TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов возможна благодаря приобретению ими иного фенотипа после контакта с непептидными антигенами, что сопровождается экспрессией CCR7, молекул МНСII, а также CD80, CD 40, CD 86, являющиеся костимуляторными. TCR- $\gamma\delta$  лимфоциты с активированным фенотипом способствуют реализации цитотоксического потенциала  $\alpha\beta$  T-клеток, вызывая их пролиферацию и дифференцировку [47, 63, 196]. Регуляторное влияние данной субпопуляции на  $\alpha\beta$ -T-клетки возможно несколькими путями посредством цитолиза, продукции различных цитокинов (IL-4, IL-10, TGF $\beta$ , IL-16, IL-17B), хемокинов (CCL4, CCL5, CCL3, MIP1), а также костимуляторных молекул [42]. Экспрессируя GITR, они оказывают антипролиферативный эффект. TCR- $\gamma\delta$  лимфоциты могут задействовать активированные В-клетки, моноциты, экспрессируя на своей поверхности CD27 и 4-1BB [102]. Приобретая хемокиновый и цитокиновый фенотип активированные TCR- $\gamma\delta$  лимфоциты оказывают влияние на антителопродукцию В-клетками, переключение классов иммуноглобулинов, формирование аутоантител, поскольку могут экспрессировать лиганды для В-клеток (CD40L, OX40, CD70, CD278) [177]. Эффекторные функции TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов характеризуются продукцией воспалительных цитокинов, цитотоксической активностью, которая сопровождается синтезом перфоринов, гранзимов А,В,С, катепсина С, серпинов.

Наравне с этим возможен Fas/FasL, TRAIL, NKG2D опосредованный цитолиз [29, 187].



**Рисунок 7** – Функции  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов. А - цитотоксичность, Б - иммунорегуляция, В - презентация антигена и праймирование  $\alpha\beta$  Т-клеточного иммунного ответа [43]

Исследования TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов, проводимые при солидных опухолях и опухолях гемопоэтической природы, свидетельствует о выраженном цитотоксическом потенциале как циркулирующих, так и резидентных TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов. Во многих работах, посвященных изучению этой субпопуляции, проведенных на опухолевых клеточных линиях, показано, что они быстро вовлекаются и активируются в процессе онкогенеза. Это возможно благодаря многообразию специализированных TCR- $\gamma\delta$  субпопуляций, вариативности эффекторных воздействий, разнонаправленному взаимодействию с клетками врожденного иммунитета, а также иммунорегуляторному влиянию на отдельные популяции лимфоцитов.

Многочисленные исследования как *in vitro*, так *in vivo* демонстрируют, что различные субпопуляции TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов могут оказывать противоположные эффекты на рост РМЖ [225]. Так  $V\gamma 9V\delta 2$ +TCR-лимфоциты, обнаруженные в ПК,

проявляют цитотоксические эффекты в отношении клеток РМЖ, усиливают апоптоз (активация проапоптотических сигналов PARP, Caspase 3) и ингибируют сигнальные пути ангиогенеза (АКТ, ERK), что показано на клеточных линиях MCF7 [23], T-47D и MDA-MB-231 [97], HER2+ SkBr7 и ER- MDA-MB-231 [220]. Эти эффекты могут зависеть от подтипа РМЖ, TCR и специфических сигнальных путей, а также могут изменяться в зависимости от уровней экспрессии MICА/В и молекул адгезии ICAM1 клетками РМЖ [220].

V $\delta$ 1+Т-лимфоциты являются преобладающей субпопуляцией ТCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов в опухоли при РМЖ и составляют от 7,2 до 75,7% среди всех опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Они оказывают проонкогенное действие посредством ряда иммуносупрессивных эффектов. Их негативное регуляторное влияние заключается в том, что V $\delta$ 1+Т-лимфоциты при РМЖ подавляют пролиферацию наивных Т-клеток и созревание дендритных клеток (ДК) посредством индукции старения, что, в свою очередь, ингибирует пролиферацию функционирующих Т-лимфоцитов CD4 клеток, Th1 и Th17 эффекторов [229]. Старение ДК приводит к нарушению их костимуляторной функции, они теряют способность обрабатывать и представлять антигены. Кроме того, V $\delta$ 1+Т-лимфоциты подавляют продукцию цитокинов, например, IL-2 CD4, CD8-клетками. Изучение механизмов, которые задействованы в индукции V $\delta$ 1+лимфоцитами старения ДК и функционирующих Т-лимфоцитов, позволило установить, что воздействие через TLR8 может предотвратить это влияние [228].

Любопытные данные представлены Zhao Y. и соавт., которые в своей работе указывают на то, что субпопуляции ТCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов обладают определенной степенью функциональной пластичности. Независимо от конфигурации их  $\gamma\delta$ -цепей, они могут быть поляризованы в различные подтипы, будь то цитотоксические клетки  $\gamma\delta$  Th-лимфоциты или FOXP3+ Treg-лимфоциты, в зависимости от цитокинового эффекта. Иными словами, опухолевое микроокружение может вызывать поляризацию ТCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов в направлении субпопуляций с выраженными иммуносупрессивными свойствами, что поддерживает опухолевый рост [235]. Хорошо изучены разные виды

опухолевого микроокружения, в частности, гипоксические ниши, которые характеризуются определенными иммунными процессами, сигнальными путями, молекулами, что поддерживает выживание опухолевых клеток. Gabrielle M. и соавт. в своей экспериментальной работе показали влияние микроокружения на цитотоксическую активность TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов. Изучив 17 образцов ткани РМЖ, они обнаружили выраженную инфильтрацию опухоли TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитами в условиях гипоксии. При этом после инкубации клеток при низких уровнях кислорода (2%) в течение 48 часов установлено повышение цитотоксичности TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов [186].

Существует несколько исследований, посвященных изучению TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов в ПК и опухолевой ткани у больных РМЖ. Gaafar A. и соавт. провели сравнение содержания TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов в ПК больных РМЖ и здоровых добровольцев. Обнаружено, что уровень TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов у здоровых лиц был в 1,6 раза выше, чем у больных РМЖ,  $p=0,002$ . Кроме того, авторами изучена была функциональная активность этих клеток: продукция IL-6 и TNF $\alpha$  была значительно выше, а IFN $\gamma$  – ниже ( $p < 0,05$ ), по сравнению с группой здоровых лиц. Вместе с тем, в субпопуляции TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов отмечены более высокое содержание эффекторных CD27-клеток, а не CD27+ клеток памяти. Наравне с этим, TCR- $\gamma\delta$  лимфоциты больных РМЖ характеризовались сниженной цитотоксичностью, что проявлялось уменьшением уровня экспрессии гранзима В ( $p < 0,02$ ) [94].

Sugie T. и соавт. в своей работе установили, что размеры первичной опухоли (индекс T) коррелируют с низкими уровнями субпопуляции циркулирующих V $\gamma$ 9V $\delta$ 2+ TCR-лимфоцитов у больных РМЖ. Это может отражать влияние опухолевого микроокружения на V $\gamma$ 9V $\delta$ 2+ TCR-лимфоциты по мере прогрессирования процесса, снижая их противоопухолевую активность [193].

Изучение TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов в опухолевой ткани, обнаружило, что они могут потенцировать опухолевый рост [172, 228]. Это нашло подтверждение в нескольких работах. Ma C. и соавт., сравнивая опухолевую ткань и здоровую

ткань МЖ 81 больной РМЖ, установили, что количество TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов в ткани положительно коррелирует с более высоким индексом T (размеры первичной опухоли), положительным статусом лимфатических узлов и экспрессией Her2-neu. Вместе с тем, у больных с более высоким уровнем содержания в опухолевой ткани TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов отмечено ухудшение безрецидивной выживаемость ( $p = 0,0004$ ) и общей выживаемости ( $p=0,002$ ). Следует отметить, что полученные данные не были специфичными для конкретного подтипа РМЖ [136].

Аналогично, Ye J. и соавт. в своей работе, изучив образцы опухолевой и нормальной ткани МЖ у 46 пациентов, обнаружили значительное увеличение количества V $\delta$ 1+ T-лимфоцитов в опухолевой ткани, а также их корреляцию с размерами первичной опухоли. Интересные данные авторами получены в эксперименте *in vitro*. Супернатанты из тканей и клеточных линий РМЖ вызывали значительную миграцию V $\delta$ 1+ T-лимфоцитов. Этот эффект не наблюдался при меланоме или колоректальном раке. При этом не было обнаружено различий в хемотаксической активности между различными подтипами РМЖ. Авторы делают предположение, что эта активность, опосредована через IP-10, который секретируется клетками РМЖ, поскольку нейтрализующее антитело к IP-10 устраняло хемотаксис. Интересно отметить, что в ткани МЖ человека V $\delta$ 1 + T-лимфоциты окружали экспрессирующие IP-10 клетки РМЖ. В эксперименте на мышинной модели инъекция V $\delta$ 1+ T-лимфоцитов человека приводила к их накоплению в месте опухоли, что не отмечено в отношении  $\gamma\delta$ 2+ и CD4+ T-клеток. Использование антитела к IP-10 приводило к ингибированию хемотаксиса и усилению CD8-опосредованного противоопухолевого иммунитета [229].

В другом исследовании изучены TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов при тройном негативном РМЖ. Авторы показали, что лимфоцитарный инфильтрат этих опухолей содержит выраженную пропорцию TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов по сравнению с нормальной тканью МЖ. Кроме того, проведенное сравнение протокового и медуллярного РМЖ, выявило различия в распределении данной субпопуляции.

При протоковом подтипе TCR- $\gamma\delta$  лимфоциты чаще локализовались в строме, тогда при медуллярном подтипе они чаще располагались в паренхиме опухоли и по краю инвазии опухолевых клеток [107].

Изучение прогностической роли TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов при РМЖ на фоне проведения неоадьювантной лекарственной терапии установило, что высокие уровни содержания этой субпопуляции коррелируют с более высокой частотой полного ответа на лечение ( $p=0,046$ ). Кроме того, в случаях проведения нео- или адьювантной терапии наблюдалось увеличение безрецидивной выживаемости ( $p = 0,040$ ) независимо от рецепторного статуса, и общей выживаемости ( $p=0,009$ ) при Her2-neu положительном РМЖ [163]. Полученные данные в отношении рецепторного статуса, к сожалению, не представляется возможным сравнить с результатами других работ, так как авторами экспрессия РП и РЭ оценивалась на основании экспрессии мРНК.

Интересные данные в отношении TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов получены Dhar S. и соавт., которые исследуя механизм действия бисфосфонатов при РМЖ обнаружили, что лизис опухолевых клеток линии MCF-7, предварительно обработанных бисфосфонатами, опосредуется данной субпопуляцией и частично зависит от NKG2D. Оказалось, что TCR- $\gamma\delta$  лимфоциты, были не способны образовывать стабильные конъюгаты и лизировать не обработанные опухолевые клетки, тогда как подвергнутые обработке золедронатом клетки опухоли были окружены TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитами, которые образовывали плотные конъюгаты с ними и лизировали их [69]. Кроме того, использование бисфосфонатов в экспериментальных работах обнаружило, что IFN $\gamma$ , секретируемый TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитами, активирует ICAM1 в клеточных линиях РМЖ (ER-положительных), и это приводит к распознаванию опухоли и торможению ее роста [31]. Наравне с этим установлено, что бисфосфонаты при РМЖ стимулируют пролиферацию и мобилизацию V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с повышенной цитотоксичностью [30].

Выявленные в экспериментальных исследованиях влияние бисфосфонатов на активность и экспансию TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов при РМЖ вызвало череду

исследований, направленных на изучение данной субпопуляции как терапевтического агента, что подчеркивает уникальную биологическую роль данной субпопуляции [51, 240]. Учеными рассматривается два возможных метода применения TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов в качестве иммунотерапии: стимуляция пролиферации субпопуляции V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> Т-лимфоцитов *in vivo* или путем адаптивного переноса после стимуляции собственных V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> Т-лимфоцитов пациента *ex vivo* с использованием бисфосфонатов. Так, показано, что пролиферация V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в присутствии золедроновой кислоты и IL-2, а также продукция IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  при ранних стадиях РМЖ коррелировали с уровнем циркулирующих V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> Т-клеток в крови пациента [193]. Интересно, что добавление IL-18 и IL-2 к золедроновой кислоте приводило к усилению пролиферации и продукции цитокинов, независимо от уровня V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в крови, что, мнению авторов, делает возможным проведение иммунотерапии V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup>Т-лимфоцитами вне зависимости от стадии опухолевого процесса [193].

В другом исследовании, посвященном метастатическому РМЖ, проведенном на мышинной модели, применяли золедроновую кислоту до начала иммунотерапии TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитами, что приводило к усилению пролиферации данной субпопуляции в очагах костных метастазов. После этого при проведении нескольких инфузий TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов мышам отмечено торможение роста костных метастазов и снижение остеолиза [240]. Полученные результаты дают основание полагать, что применение бисфосфонатов в комбинации с TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитами у больных при метастатическом РМЖ может быть также эффективно.

Использование TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов в комбинации с трастузумабом также выявило положительные результаты. В работе Carietto А.Н. и соавт., проведенной на клеточных линиях Her2-положительного РМЖ, установлено, что сочетанное применение трастузумаба и TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов приводило к подавлению опухолевого роста [51], что может служить отправной точкой для дальнейших исследований TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов как терапевтического агента.

### 1.5 Моноциты, нейтрофилы

В ходе многочисленных исследований установлено, что моноциты, составляя не более 11% от мононуклеаров крови, играют важную роль в противоопухолевом иммунном ответе. Они являются предшественниками тканевых макрофагов, которые как известно могут обладать как проопухолевым (M2), так и противоопухолевым фенотипом (M1), что, безусловно, оказывает влияние на выраженность и направленность иммунного ответа. Фенотип и функциональная активность моноцитов ПК до недавнего времени были малоизученными. На сегодняшний день известно, что пул циркулирующих моноцитов разнороден. В ПК выделяют несколько популяций моноцитов, отличающиеся своими свойствами. Одна из них отличается выраженной продукцией хемокинов, фагоцитирующей активностью. Это так называемые классические моноциты CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>. Другая популяция моноцитов ПК (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) способна к активной миграции и продукции провоспалительных цитокинов. Существует еще фракция промежуточных моноцитов.

Описано, что в ПК больных РМЖ изменяется не только количество моноцитов, но и пропорция их субпопуляций [19, 82]. Появляется все больше доказательств, что в крови больных РМЖ преобладают моноциты с провоспалительным фенотипом (M2-подобные), аналогичные тем, что обнаруживаются в опухоли. Они отличаются сниженной чувствительностью к ИФН  $\alpha$ ,  $\gamma$ , сниженной продукцией провоспалительных цитокинов и увеличенной продукцией ИЛ8, ИЛ10. Сниженное содержание моноцитов с провоспалительным фенотипом является признаком прогрессирования РМЖ, коррелирует с выраженной инфильтрацией опухоль-ассоциированными макрофагами, активацией CSF-1R, короткой безрецидивной выживаемостью. В исследованиях В. Zang и R.M. Lafrenie показано, что в ПК больных РМЖ с метастатическими опухолями увеличена пропорция M2-подобных моноцитов и снижено число HLA-DR<sup>+</sup> зрелых моноцитов [124, 233]. Авторы отметили наличие взаимосвязи уровня моноцитов с размером и распространенностью опухоли, а также с прогнозом заболевания. Интересно, что при рецидиве РМЖ моноциты характеризовались

повышенной чувствительностью к ИФН- $\alpha$ , повышенной продукцией ИЛ-12 [209]. По мнению ученых, эти данные позволяют рассматривать фенотип моноцитов как прогностический маркер распространенности РМЖ. Так, M.V. Dieci и соавт. отметили, что при люминальном РМЖ прогрессирование болезни было связано с преобладанием популяции промежуточных моноцитов (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) над фракцией классических моноцитов (CD14<sup>hi</sup> CD16<sup>-</sup>) [70].

Что касается общего процентного содержания моноцитов крови, то прогностическая значимость его весьма спорна. Хотя некоторые исследователи указывают на наличие связи между высоким содержанием моноцитов и некоторыми благоприятными факторами прогноза, например, уровнем CD8<sup>+</sup>TIL. Кроме того, Kresovich J.K. и соавт. сообщают о том, что повышенные уровни моноцитов ассоциированы с низким риском развития РМЖ [122]. Другими авторами, напротив, утверждается, что низкое содержание моноцитов ПК способствует лучшей выживаемости [103, 164]. Такая вариативность прогностического значения во многом, как полагают исследователи, может быть обусловлена разными методами подсчета моноцитов, а также схемами терапии РМЖ.

Еще одна важная популяция клеток врожденного иммунитета представляет интерес – нейтрофилы, которые реализуют свое противоопухолевое воздействие напрямую или через стимуляцию Т-клеточного звена. Доказана способность нейтрофилов претерпевать поляризацию, образуя разные по функциональности субпопуляции клеток, именуемые нейтрофилами N1 и N2. Они существенно отличаются по своей цитотоксичности, рецепторному репертуару (ФНО, Fas, молекулы хемокинов), секреции цитокинов и обладают диаметрально противоположными свойствами касательно опухоли.

В отношении роли нейтрофилов при РМЖ представлено немало научных работ. Сообщается, что уровень их содержания в ПК имеет важное клиническое значение [71, 78]. Предиктором плохого прогноза при РМЖ является высокое содержание нейтрофилов, что коррелирует с повышенным уровнем циркулирующих опухолевых клеток, инвазией в лимфатические узлы, снижением

выживаемости [66, 105, 134]. Также прогностическим признаком считается соотношение нейтрофилов и лимфоцитов ПК. Повышенное его значение коррелирует с плохим прогнозом в независимости от распространенности опухолевого процесса [200].

Имунофенотипическое изучение опухоли позволило установить, что степень инфильтрации нейтрофилами опухоли и их популяционный состав определяют выраженность и направленность иммунного ответа. Преобладание в опухоли нейтрофилов с выраженной цитотоксической активностью способствует привлечению клеток-эффекторов в опухолевую ткань и экспансии их субпопуляций. Важно отметить, что при различных биологических подтипах РМЖ значимость уровня циркулирующих нейтрофилов неодинакова [218]. Неблагоприятное влияние высокого уровня нейтрофилов реализуется в случае трижды-негативного и HER2 позитивного РМЖ. В своей работе Szczerba В.М. и соавторы описывают тесную связь между фенотипом нейтрофилов и стимулированием метастазирования при инвазивном РМЖ [197]. Выполнив секвенирование РНК, авторы выявили, что в большинстве случаев циркулирующие опухолевые клетки, обнаруженные при РМЖ, были связаны с нейтрофилами. Также исследователи отметили способность ассоциированных с циркулирующими опухолевыми клетками нейтрофилов индуцировать пролиферацию циркулирующих опухолевых клеток через IL-6 и IL-1 $\beta$ , увеличивая их метастатический потенциал. Кроме того, Szczerba В.М. и соавторы сообщают, что Г-КСФ-содержащие терапевтические средства могут способствовать увеличению кластеров ассоциированных с циркулирующими опухолевыми клетками нейтрофилов [197].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Характеристика больных РМЖ

В настоящем исследовании представлены данные 64 пациенток с диагнозом РМЖ и 10 пациенток с доброкачественными заболеваниями ткани МЖ (фиброаденома, фиброзно-кистозная мастопатия, аденоз молочной железы, внутрипротоковая папиллома), которые получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2015г. по 2018г. Основными критериями включения в исследование являлось изучение образцов костномозгового пунктата у первично-операбельных больных РМЖ. Пациентки, получавшие неоадьювантное лечение, из исследования были исключены. У каждой пациентки в обеих исследуемых группах было взято письменное согласие (отображено в стационарной карте) на проведение стерильной пункции, с подробным разъяснением цели процедуры. Полученные результаты миелограммы переданы пациенткам с интерпретацией заключения.

Детально изучены истории болезни, поликлинические карты, протоколы операций, гистологические исследования послеоперационного материала. При обработке материала учитывались такие клинические данные как возраст, стадия заболевания, состояние регионарных лимфатических узлов. Объем операций, гистологические особенности послеоперационного материала, варианты лечебных мероприятий также являлись объектами исследования научного труда.

Возрастной интервал в группе пациенток с диагнозом РМЖ варьировал от 28 до 77 лет. Средний возраст составил 56 лет. В контрольной группе пациенток с доброкачественными изменениями в ткани МЖ возраст варьировал от 33 до 70 лет; средний возраст составил 46 лет. В исследуемой группе больных рак *in situ* наблюдался в трех случаях (4,1%). У 15 (20,3%) больных была диагностирована I стадия, у 27(36,5%) - наблюдалась IIА стадия, у 18 (24,3%) пациенток выявлена IIВ стадия РМЖ. У одной пациентки (1,4%) был установлен РМЖ из первично не выявленного очага (Таблица 1).

**Таблица 1** – Распределение больных РМЖ по стадиям заболевания

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

В рамках догоспитального обследования всем пациенткам выполнялись маммография, ультразвуковое исследование МЖ и регионарных зон метастазирования. У двух (3,1%) больных опухолевое образование располагалось в центральном квадранте; у 7 (10,9%) пациенток был поражен верхне-внутренний квадрант; в нижне-внутреннем квадранте узловое образование определялось у 7 (10,9%) пациенток. Наиболее частой локализацией опухоли был верхне-наружный квадрант МЖ, что установлено в 31 (48,4%) случае. Наличие узлового образования в нижне-наружном квадранте определено у 5 (7,8%) пациенток. У 11 (17,2%) пациенток распространение опухолевого узла было более чем на одну из зон МЖ. В одном (1,6%) случае локализация не уточнена (Таблица 2).

**Таблица 2** – Локализация первичной опухоли относительно квадрантов МЖ

Квадранты молочной железы	n(%)
C50.1 – центральный квадрант	2 (3,1%)
C50.2 – верхне-внутренний квадрант	7 (10,9%)
C50.3 – нижне-внутренний квадрант	7 (10,9%)
C50.4 – верхне-наружный квадрант	31 (48,4%)

С50.5 – ниже-наружный квадрант	5 (7,8%)
С50.8- поражение выходит за пределы указанных локализаций	11 (17,2%)
С50.9 – неуточненная часть молочной железы	1 (1,6%)
Итого	64 (100%)

По результатам проведенного маммографического и ультразвукового обследования установлено, что у 55 (85,9%) больных РМЖ был одиночный узел в ткани МЖ. У трех (4,7%) пациенток определялись по 2 узловых образования, в одном (1,6%) случае выявлены три опухолевых узла в МЖ. У 5 (7,8%) пациенток по данным обследований узловые образования в МЖ не найдены. Из них у 1 больной проявления заболевания в МЖ отсутствовали и определялся лишь пораженный аксиллярный лимфатический узел (РМЖ из первично не выявленного очага). Трое пациенток поступили в отделение опухолей молочных желез после нерадикальной операции, макроописание послеоперационного материала отсутствовало; у одной пациентки выявлен внутрипротоковый рак.

Размер опухолевого узла варьировал от 0,5 до 7 см в наибольшем измерении. У большинства больных опухолевый узел имел размер в пределах от 2,1 до 3 см, что отмечено в 25 (39,1%) случаях. У 8 (12,5%) пациенток размер опухолевого узла составил 0,5-1 см. В 16 (25%) случаях размер первичной опухоли составил от 1,1 до 2 см. У 5 (7,8%) пациенток выявлен узел размерами от 3,1 до 4 см, у одной (1,6%) пациентки – 4,1 до 5,0 см; у 2 (3,1%) больных – от 5,1 до 6 см. Максимальный размер первичной опухоли составил от 6,1 до 7 см, что обнаружено в 2 (3,1%) случаях. У 5 (7,8%) пациенток узел в МЖ отсутствовал (Таблица 3).

**Таблица 3** – Распределение размеров опухолевого узла при РМЖ

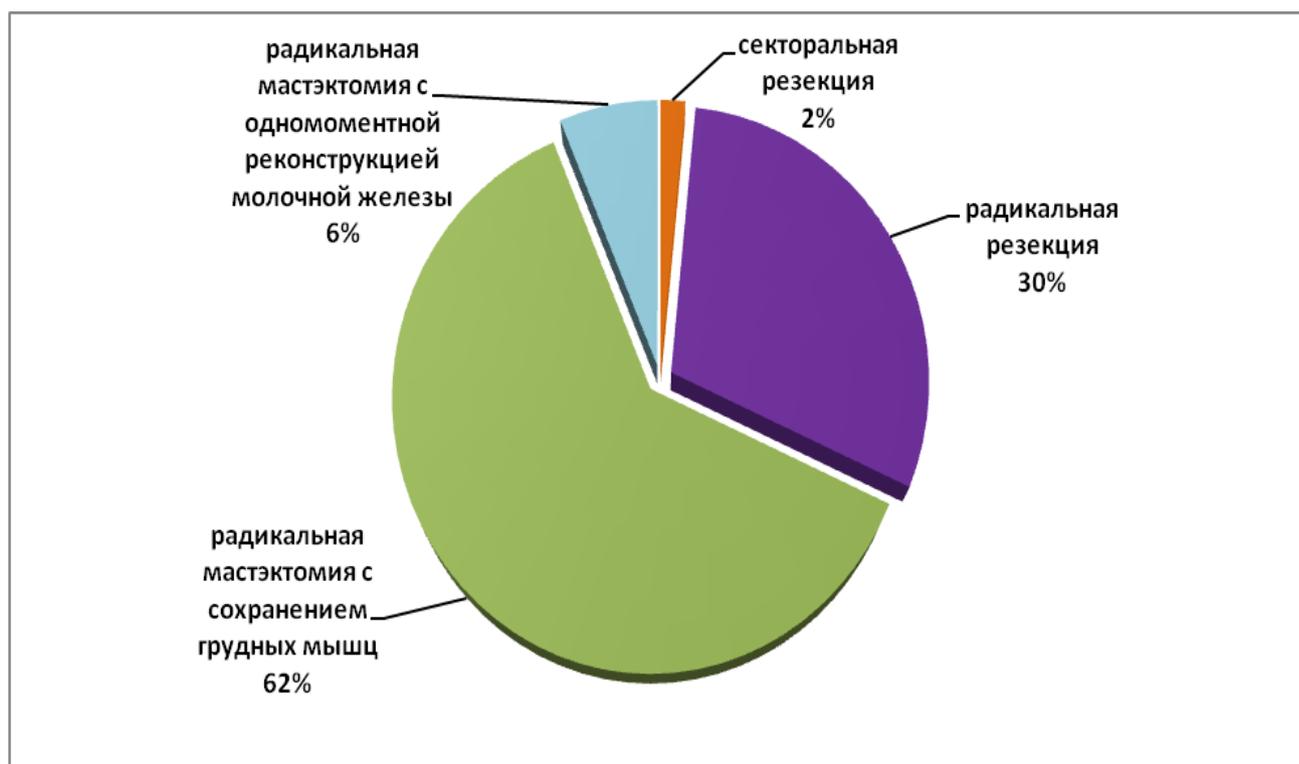
Размер опухолевого узла (см)	n(%)
0,5-1,0	8 (12,5%)
1,1- 2,0	16 (25,0%)
2,1-3,0	25 (39,1%)
3,1-4,0	5 (7,8%)
4,1-5,0	1 (1,6%)
5,1-6,0	2 (3,1%)
6,1-7,0	2 (3,1%)
Отсутствует	5 (7,8%)
Итого	64 (100%)

По результатам оценки вовлеченности регионарных лимфатических узлов (аксиллярной и парастернальной групп, лимфатических узлов над- и подключичной областей) установлено следующее. В 50 (78,1%) случаях поражение лимфатических узлов отсутствовало. Метастазы в лимфатических узлах аксиллярной группы наблюдались у 10 (15,6%) больных. В одном (1,6%) случае было выявлено поражение подключичных лимфатических узлов. Поражение парастернальной группы лимфоузлов определялось у 1 (1,6%) пациентки. Метастазы в лимфоузлы двух и более групп наблюдалось у 2 (3,1%) больных (Рисунок 8).

Всем пациенткам, вошедшим в исследование, на первом этапе было проведено хирургическое лечение в объеме: секторальной резекции – 1 (2%) пациентке, органосохраняющей операции – радикальной резекции молочной железы – 19 (30%) пациенткам, мастэктомии с сохранением грудных мышц – 39 (62%) пациенткам, мастэктомии с одномоментной реконструкцией молочной железы – 4 (6%) пациенткам. Одной (1,6%) пациентке было выполнено оперативное вмешательство в объеме аксиллярной лимфодиссекции (Рисунок 9). Выполненные хирургические вмешательства носили радикальный характер.



**Рисунок 8** – Состояние регионарных лимфатических узлов при РМЖ

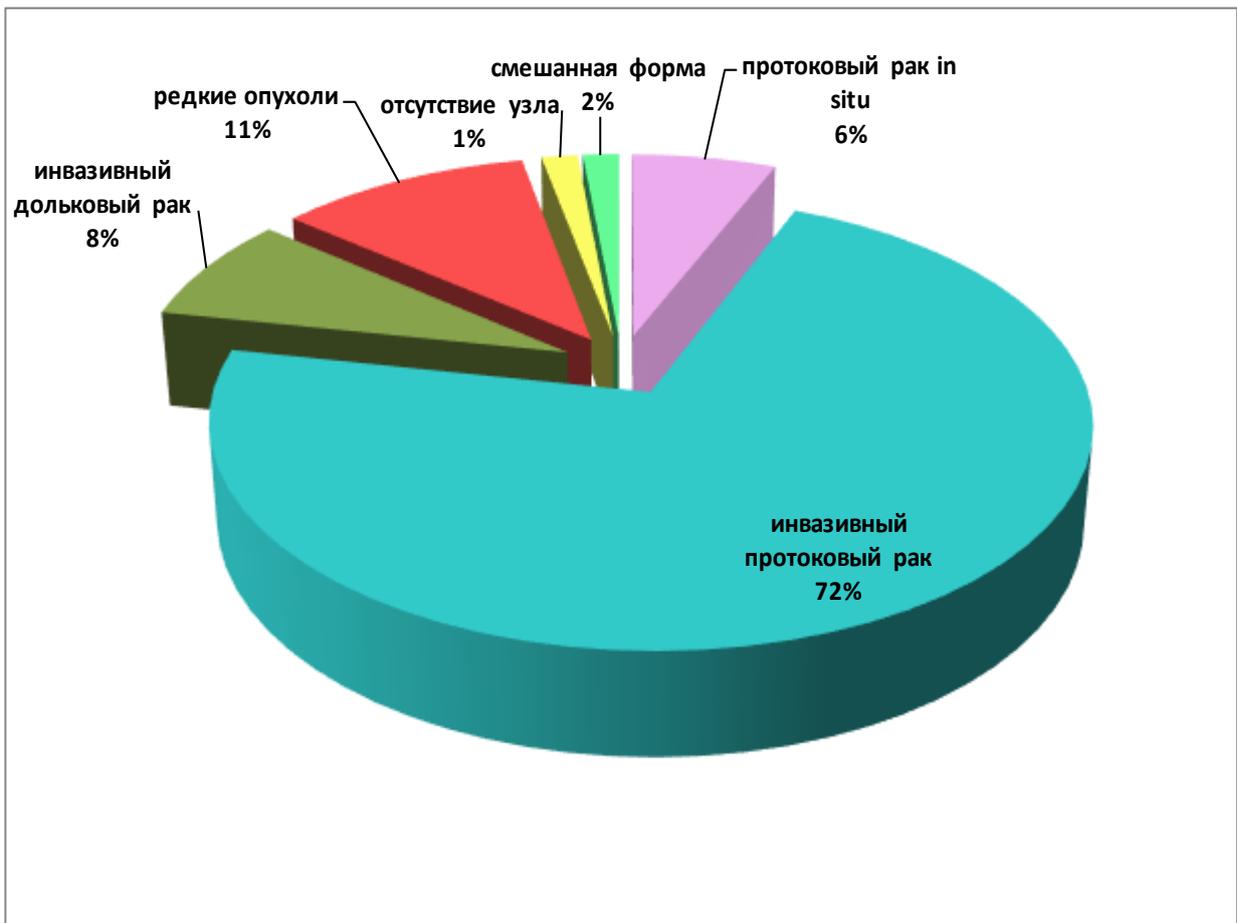


**Рисунок 9** – Объемы оперативных вмешательств при РМЖ

По результатам планового гистологического исследования среди 53 (83%) пациенток был выявлен один опухолевый узел в препарате; в послеоперационном

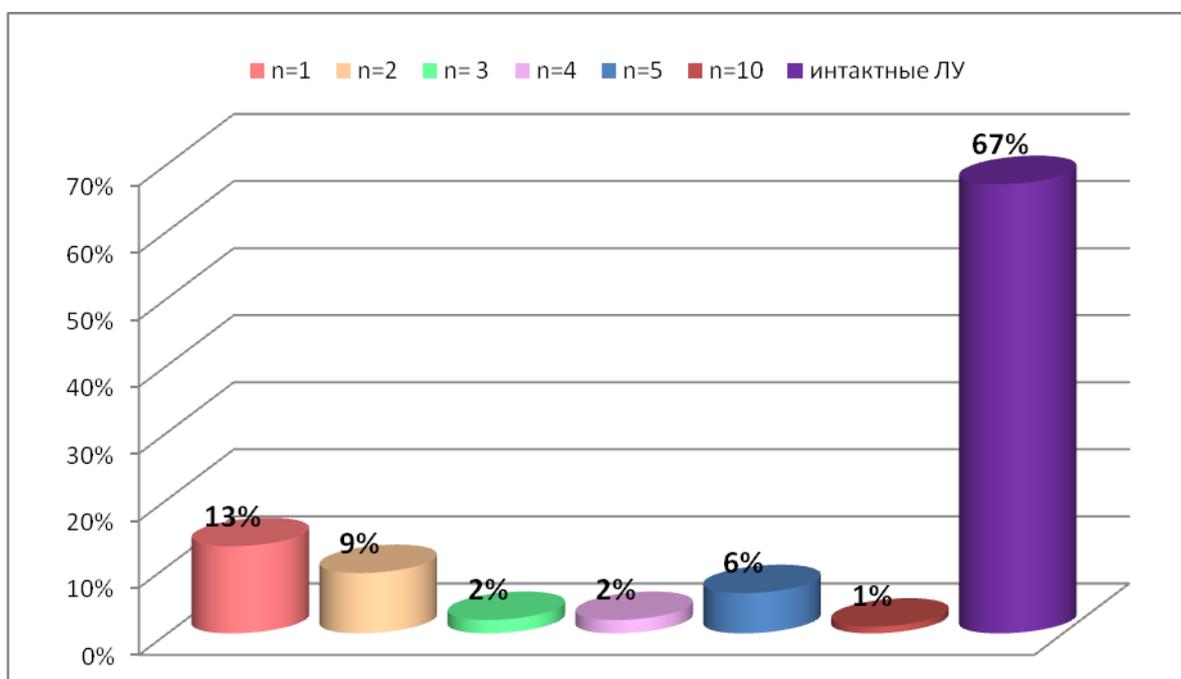
материале у 4 (6%) пациенток определено 2 опухолевых узла; три узловых образования определено всего лишь у одной (1%) пациентки. У 6 (9,4%) пациенток при плановом гистологическом исследовании опухолевый узел отсутствовал (у трех пациенток верифицирован рак *in situ*, три пациентки поступили в отделение после нерадикальных операций).

Распределение больных РМЖ в зависимости от гистологического типа опухоли было следующим. В большинстве случаев (48 пациенток- 72%) определен инвазивный протоковый рак. У 3 (6%) пациенток выявлен протоковый рак *in situ*. В 5 (8%) случаях установлен инвазивный дольковый рак. У 7 (11%) пациенток наблюдались редкие гистологические виды РМЖ: тубулярный, медуллярный и папиллярный, метапластический. В одном случае (2%) РМЖ был смешанного строения (Рисунок 10).



**Рисунок 10** – Гистологические типы РМЖ

Гистологическое исследование удаленных лимфатических узлов установило, что в большинстве случаев (43 - 67%) лимфатические узлы были интактны. У восьми пациенток (13%) в результате исследования определялся один метастатически измененный лимфатический узел. В 6 (9%) случаях количество пораженных лимфатических узлов составило 2. У одной пациентки (2%) выявлено три пораженных лимфатических узла; 4 пораженных лимфоузла также определилось у одной пациентки (2%). Метастазы в 5 лимфатических узлах найдены у 4 (6%) больных. Максимальное количество метастатически измененных лимфатических узлов составило 10, что выявлено в одном случае (1%) (Рисунок 11).



**Рисунок 11** – Количество метастатически измененных лимфатических узлов по данным гистологического исследования послеоперационного материала

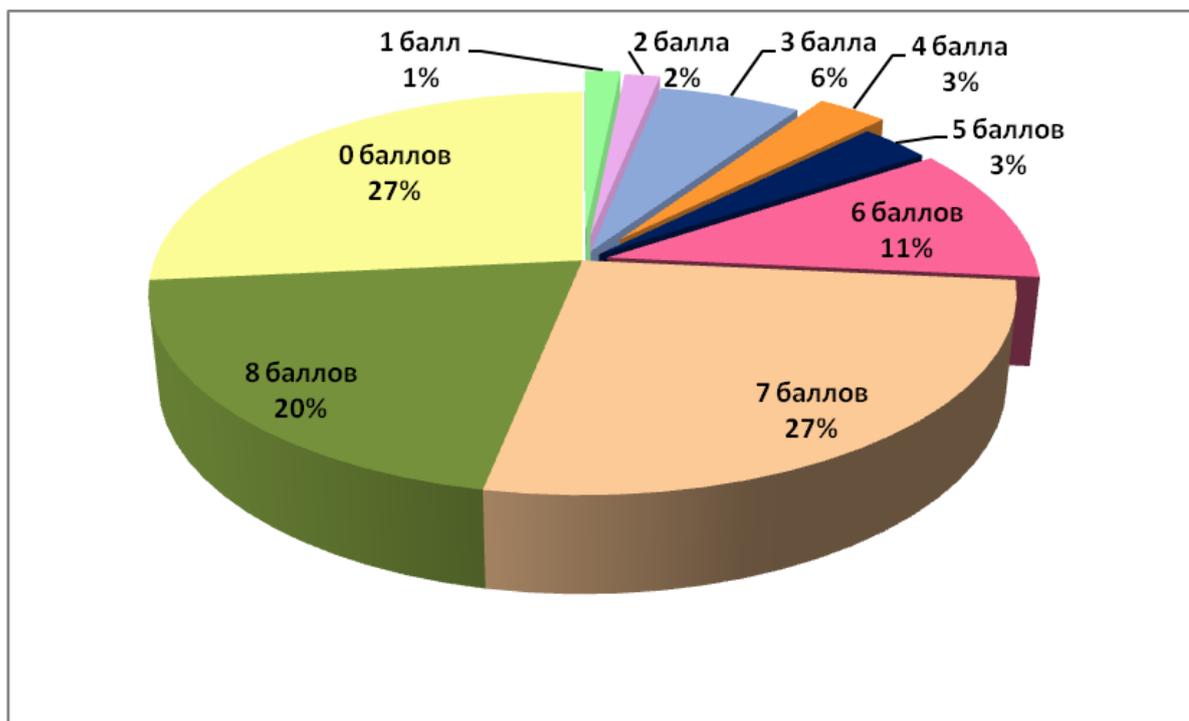
Степень злокачественности опухоли определена у 63 больных. У большинства из них (69%) установлено, что РМЖ соответствовал 2 степени злокачественности. Первая степень злокачественности опухолевого процесса определена в 8 (12,5%) случаях. У 11(17,2%) больных опухоль была третьей степени злокачественности.

При изучении морфологического строения опухолевой ткани отмечен ряд особенностей. В 17 (26,6%) случаях выявлены опухолевые эмболы в кровеносных и лимфатических сосудах опухоли. Периневральная инвазия наблюдалась в одном случае (1,6%). В 9 (14,1%) случаях установлена лимфоидная инфильтрация стромы опухоли. Фокусы протокового рака *in situ*, криброзного и папиллярного типа установлены в 2 (3,1%) образцах опухоли. Множественные рассеянные микрокальцинаты по ткани молочной железы выявлены в одном случае (1,6%). Метапластический рак также определен в одном случае (1,6%) (Таблица 4).

**Таблица 4** – Гистологические особенности РМЖ

Гистологические особенности РМЖ	n(%)
Опухолевые эмболы в кровеносных и лимфатических сосудах	17 (26,6%)
Периневральная инвазия	1 (1,6%)
Прорастание кожи	1 (1,6%)
Лимфоидная инфильтрация стромы	9 (14,1%)
Отсутствуют	33 (51,6%)
Фокусы DCIS криброзного и папиллярного типа	2 (3,1%)
Метапластический рак	1 (1,6%)
Итого	64 (100%)

Определение рецепторов эстрогена в опухолевой ткани установило следующее. В большинстве случаев отмечена 7 балльная экспрессия, либо ее отсутствие, что наблюдалось в равном проценте случаев: 17 (27%) и 17 (27%). В незначительно меньшем числе наблюдений (n=13, 20%) установлена экспрессия 8 баллов. Экспрессия рецепторов эстрогена не более 2 баллов выявлена у 2 пациенток. У 4 (6%) больных опухоль характеризовалась экспрессией рецепторов к данному гормону в 3 балла, а у 2 (3%) – 4 балла. Уровень экспрессии 5 баллов и 6 баллов наблюдался в 2 (3%) и 7 (11%) случаях соответственно (Рисунок 12).

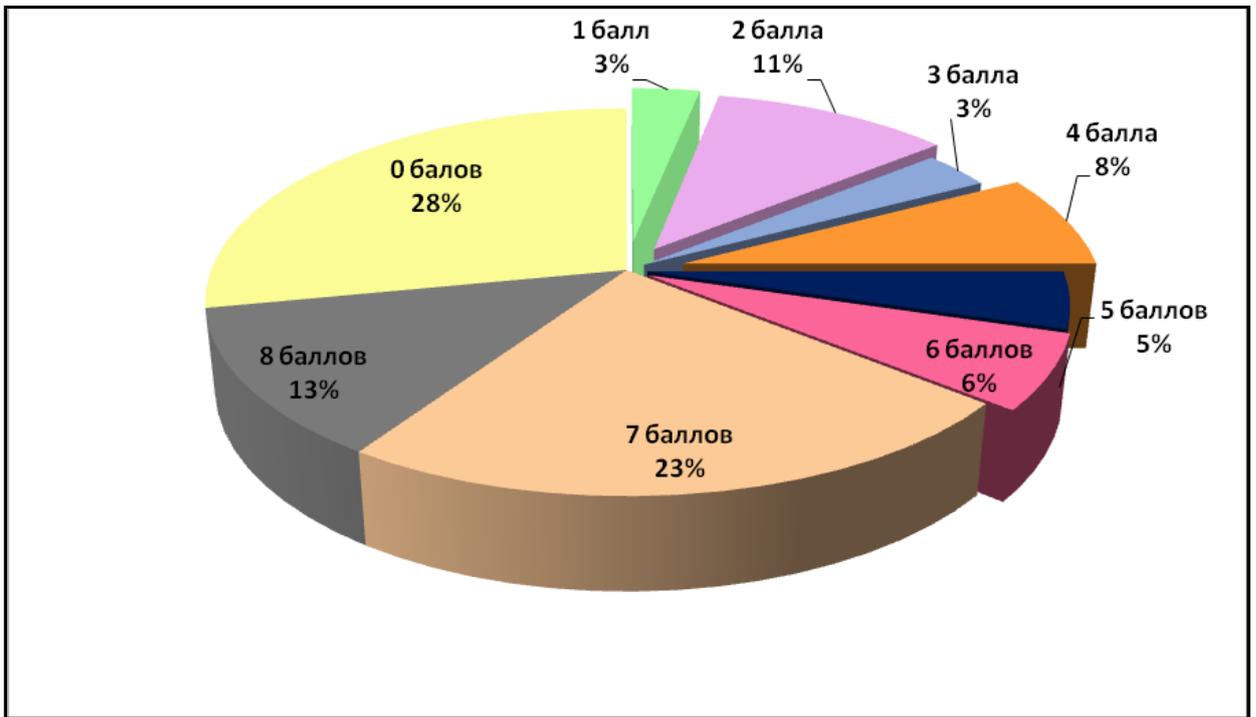


**Рисунок 12** – Распределение больных РМЖ в зависимости от экспрессии рецепторов эстрогена

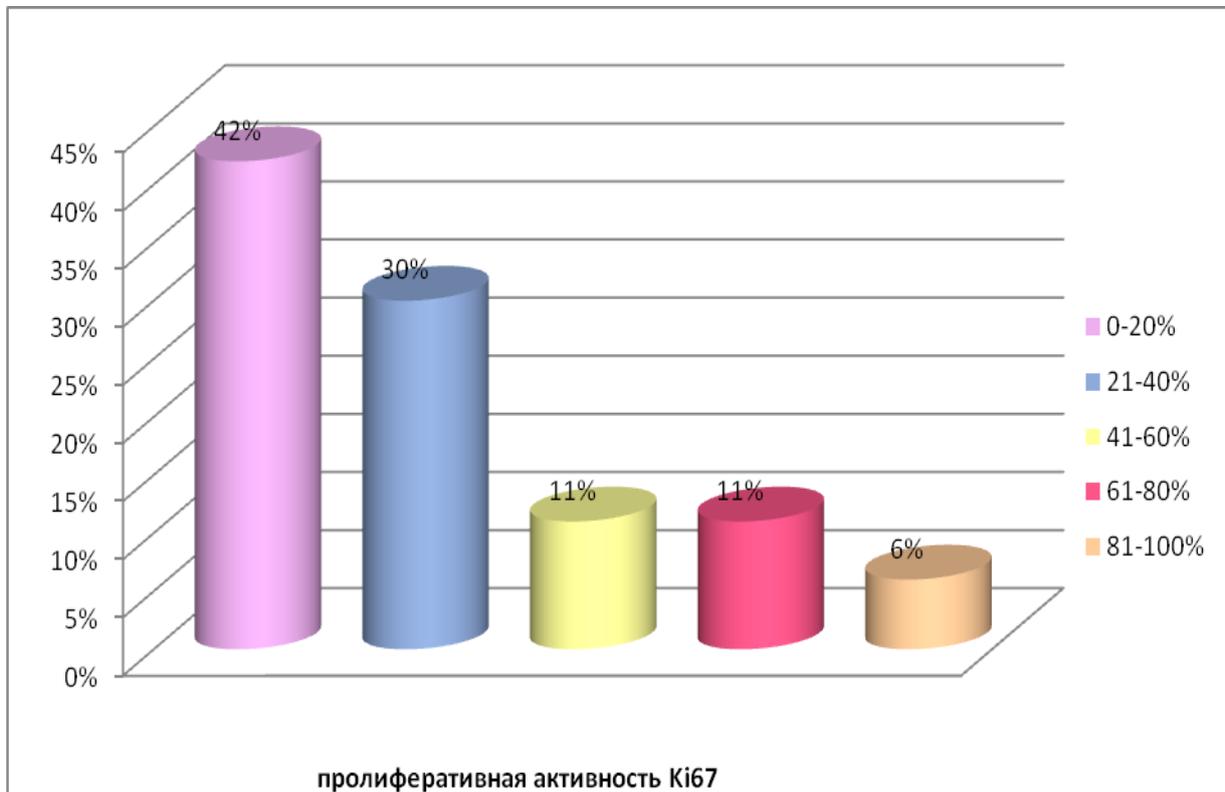
Определение экспрессии рецепторов прогестерона установило, что в 13% (n=18) случаев она отсутствовала, а в 23% (n=15) ее уровень соответствовал 7 баллам. В равном количестве случаев отмечена экспрессия в 1 балл (n=2, 3%) и 3 балла (n = 2, 3%). Не превышал 2 баллов уровень экспрессии у 7 (11%) пациенток. Экспрессия рецепторов прогестерона в размере 4 и 5 баллов отмечена в 5 (8%) и 3 (5%) случаях соответственно. В остальных случаях выявлен уровень, соответствующий 6 баллам (n=4, 6%) и 8 баллам (n=8, 13%) (Рисунок 13).

Распределение больных в зависимости от статуса Her-2neu было следующим: Her2neu «+» - у 22 пациенток, Her2neu «-» - среди 42 пациенток.

Оценка индекса пролиферативной активности опухолевых клеток показала, что у 27 (42%) пациенток Ki-67 был от 0 до 20%; у 19 (30%) пациенток этот показатель находился в интервале от 21 до 40%; у 7 (11%) пациенток – от 41 до 60%. Ki-67 в диапазоне 61-80% наблюдался в 7 (11%) случаях, а в 4(6%) образцах опухоли этот показатель составил 81-100% (Рисунок 14).

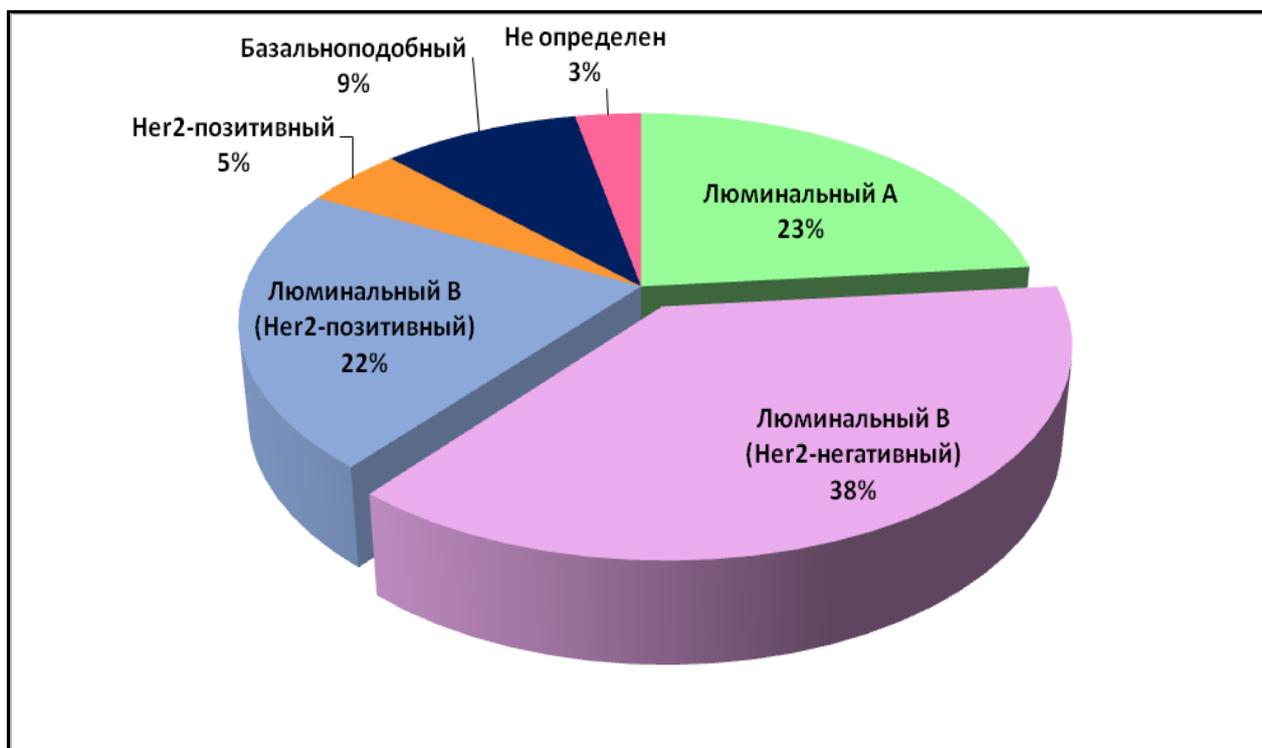


**Рисунок 13** – Распределение больных РМЖ в зависимости от экспрессии рецепторов прогестерона<sup>1</sup>



**Рисунок 14** – Распределение больных РМЖ в зависимости от индекса пролиферативной активности

В зависимости от молекулярного подтипа больные распределились следующим образом: люминальный А тип опухоли определен у 15 (23%) пациенток; люминальный В (Her2- негативный) тип – у 23 (38%) пациенток; люминальный В (Her2- позитивный) тип опухоли выявлен у 14 (22%) пациенток; Her2- позитивный тип определен лишь у 3 (5%) пациенток; базальноподобный тип опухоли выявлен у 6 (9%) пациенток. У 3 (3%) пациенток принадлежность опухоли к люминальным типам не определена (выявлен внутрипротоковый рак *in situ*) (Рисунок 15).



**Рисунок 15** – Распределение больных в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ

После прохождения этапа оперативного лечения определенной части пациенток была назначена адъювантная химиотерапия. Типы и количество курсов распределились следующим образом. 15 (23%) пациенток получили 4 курса полихимиотерапии по схеме Циклофосфан + Доксорубицин (АС); 5 (8%) пациенток – 4 курса полихимиотерапии по схеме Циклофосфан + Доксорубицин и 4 курса Доцетаксел (АС+Т); 6 (9%) пациенток – 12 еженедельных курсов Доцетаксел (Т); 1 (2%) пациентка получила лечение по схеме 4 курса

Циклофосфан + Доксорубин и Золадекс (АС + Золадекс); 8 (12%) пациенток – полихимиотерапия по схеме 4 курса Циклофосфан + Доксорубин и 12 еженедельных курсов Доцетаксел; 1 (2%) пациентка–полихимиотерапия по схеме 6 курсов Циклофосфан + Доксорубин и Золадекс; 8 (12%) пациенток – 4 курса по схеме Доксорубин + Доцетаксел (АТ); 6 курсов Капецитабина получила 1 (2%) пациентка. Одной пациентке (2%) была проведена адъювантная полихимиотерапия по схеме Доцетаксел + Карбоплатин; 1 (2%) пациентка – 4 курса по схеме Доцетаксел + Циклофосфан (ТС) (Таблица 5).

**Таблица 5** – Варианты адъювантной полихимиотерапии больных РМЖ

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

Адъювантная гормонотерапия не была назначена 20 (31%) пациенткам. 32 (50%) пациентки получили тамоксифен; 12 (19%) пациенток адъювантной полихимиотерапии - ингибиторы ароматазы. Золадекс был назначен в двух случаях для исключения функции яичников, поскольку достоверные лабораторные данные за менопаузу у пациенток отсутствовали.

Длительность получения пациентками гормонотерапии распределилась следующим образом: 11 (17,2%) пациенток принимали препараты на протяжении

1 года, 2 (3,1%) пациентки адъювантной полихимиотерапии в течение 3 лет, 26 (40,6%) пациенток принимали препараты 5 лет; на протяжении же 10 лет гормонотерапию получали лишь 5 (7,8%) пациенток. Гормонотерапия не была назначена 20 (31,3%) пациенткам.

Адъювантная таргетная терапия Герцептином проводилась 14 (22%) пациенткам. Послеоперационная лучевая терапия (суммарная очаговая доза адъювантной полихимиотерапии –50 Гр) проводилась 23 (36%) пациенткам.

## 2.2 Методы исследования

### *Определение рецепторного статуса РМЖ*

Определение рецепторного статуса проводили иммуногистохимическим методом в инвазивном компоненте опухоли [96]. Учет реакции осуществлялся полуколичественным методом. В зависимости от интенсивности окрашивания ядер опухолевых клеток присваивали баллы, где 0 баллов соответствовало отсутствию реакции, 1 балл – однородной бледной окраске, 2 балла – однородной/неоднородной умеренной, 3 балла – однородной темной. Аналогично по бальной системе проводили учет доли окрашенных ядер опухолевых клеток: до 1% окрашенных клеток – 1 балл, 1-10% окрашенных клеток – 2 балла, 11-33% окрашенных клеток – 3 балла, 34-66% окрашенных клеток – 4 балла, 67-100% окрашенных клеток – 5 баллов.

### *Определение Her-2neu статуса РМЖ*

Изучение экспрессии на мембране опухолевой клетки белка Her-2neu выполнялось иммуногистохимическим методом в инвазивном компоненте РМЖ, на основании интенсивности окраски мембран клеток [155]. Результаты учитывались в баллах, где 0 баллов – отсутствие/неполная окраска  $\leq 10\%$  опухолевых клеток; 1 балл – неполная окраска  $\geq 10\%$  опухолевых клеток; 2 балла – неполная яркая/мономорфная бледная окраска  $> 10\%$  опухолевых клеток / яркая циркулярная мембранная окраска  $\leq 10\%$  опухолевых клеток; 3 балла — циркулярная яркая и интенсивная мембранная окраска  $> 10\%$  опухолевых клеток. Her2/neu негативный рак соответствовал 0/1 баллу, позитивный – 3 баллам. В

случае 2 баллов требовалось проведение FISH реакции для уточняющей диагностики.

### ***Морфологическое исследование КМ***

Забор КМ осуществлялся путем стерильной пункции в объеме 0,25-0,5 мл во избежание контаминации образца периферической кровью. Приготавливали по 6 морфологических препаратов, которые фиксировали в готовом красителе Май-Грюнвальда. Затем проводили окрашивание в течение 30 мин по методу Романовского. Для этого использовали раствор из 1 мл готовой жидкой краски + 5,8-6,0 мл основного буферного раствора + 47 мл дистиллированной воды. Микроскопия готовых препаратов осуществлялась двумя независимыми экспертами-морфологами. Первым этапом выполнялась ориентировочная оценка количества миелокарицитов КМ: содержание миелокарицитов считается нормальным, если при просмотре под иммерсионным объективом (увеличение 100 x 10) в каждом поле зрения встречается 15-25 клеток, менее 15 клеток – сниженным (гипоклеточный пунктат), более 25 клеток – повышенным (гиперклеточный пунктат) [8]. Далее проводился подсчет клеточных элементов и расчет индексов миелограммы (индекса созревания эритрокарицитов, индекса созревания нейтрофилов, соотношение лейкоцитов и эритроцитов). Полученные при морфологическом подсчете данные были сопоставлены с общепринятой в настоящее время гематологической нормой по А.И. Воробьеву. В наше исследование были включены только те миелограммы, в которых морфологически была исключена примесь периферической крови.

### ***Иммунофенотипирование КМ***

Материал для иммунологического исследования собирался в пробирки, импрегнированные ЭДТА. Весь КМ переливался в пробирки доводился буферным раствором до объема 10 мл, затем образец центрифугировался. После удаления надосадочной жидкости выполняли добавляли лизирующий раствор и оставляли образец на 8-10 минут при комнатной температуре. По истечении времени клетки КМ отмывали буферным раствором путем центрифугирования. После выделения клеток КМ их инкубировали с моноклональными антителами,

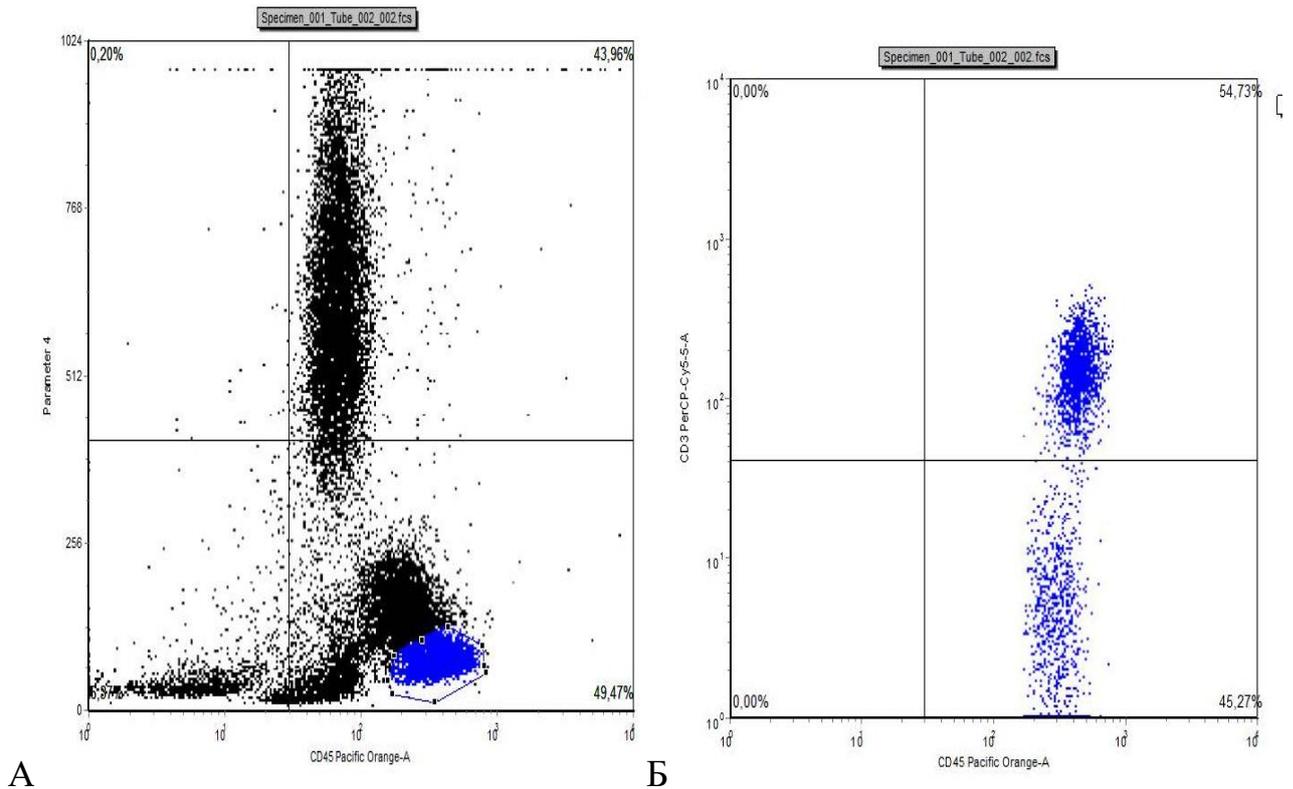
меченными флюорохромами, в течение 30 минут. Затем пробы отмывали буферным раствором, центрифугировали, надосадочную жидкость сливали. Эту процедуру повторяли дважды. Сбор клеток и запись соответствующих файлов проводили на проточном цитометре FACSCanto II. Анализ данных проводили с помощью программы FCS3. В таблице 6 приведены панели антител, использованных в работе.

**Таблица 6** – Специфичность антител и их флуоресцентная метка, использованные для изучения субпопуляций лимфоидных клеток у больных РМЖ

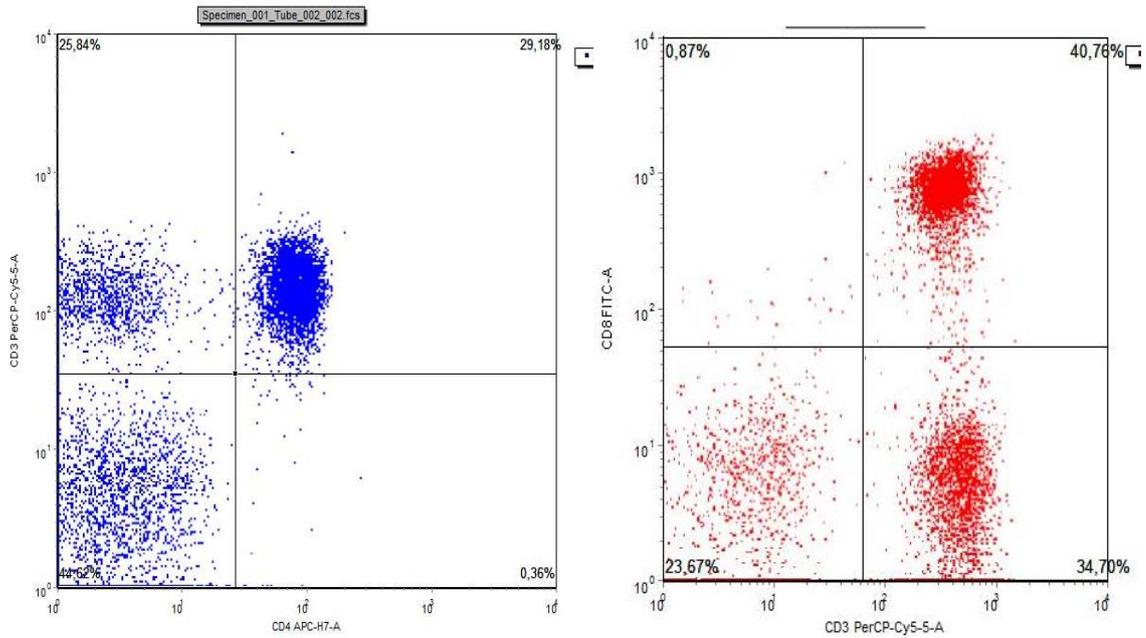
№ пробы	Флуорохромы и специфичность антител							
	FITC	PE	PerCP-Cy5	PerCP-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500
1	CD20	CD95	CD27	CD5	CD3	CD19	CD4	CD45
2	CD22	CD38	CD27	CD5	CD3	CD19	–	CD45
3	CD4	CD25	CD3	TCR $\gamma\delta$	CD5	CD8	CD2	CD45
4	CD16	CD45RO	CD3	CD56	CD94	CD8	CD2	CD45
5	CD16	HLA-DR	CD3	CD56	CD94	CD8	CD2	CD45
6	CD16	CD7	CD3	CD56	CD94	CD8	CD2	CD45
7	Perforin	Granzyme	CD3	CD56	CD94	–	–	CD45
8	CD57	CD26	CD3	CD56	CD94	–	–	CD45

Для каждой пробы собирали не менее 100.000 событий. Исследования субпопуляций лимфоцитов КМ проводили в гейте CD45<sup>++</sup> клеток с низкими характеристиками бокового светорассеяния лазерного луча (SSC<sup>low</sup>). Пробы 1 и 2 предназначены для изучения врожденного звена В-клеточного иммунитета (В1-клеток), применяли антитела к CD19, CD20- В-лимфоцитов, наряду с изучением CD5 в пределах В-клеток с гейтированием по CD45. Проба 3 – характеристика TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов. Пробы 4-6 – характеристика NK- и NKT-лимфоцитов. Эти пробы включали CD16, CD56 наряду с обязательным изучением CD3 в гейте CD45<sup>+</sup> лимфоцитов.

Ниже приводится пример анализа субпопуляций КМ после сбора клеток на проточном цитометре. В данном случае продемонстрирована оценка экспрессии четырех антигенов: панлейкоцитарного CD45, Т-клеточных CD3, CD4, CD8. Каждый рисунок снабжен подрисуночной подписью. Первым этапом проводится гейтирование: выделяется популяция клеток, экспрессирующая панлейкоцитарный маркер CD45. Далее проводится анализ экспрессии различных маркеров в пределах популяции CD45+лимфоцитов (Рисунок 16 (А, Б, В, Г)).



**Рисунок 16 А, Б** – Анализ экспрессии маркеров в пределах популяции CD45+лимфоцитов. А – Общее количество CD45+ клеток в образце КМ. По оси абсцисс отмечена экспрессия CD45+, а по оси ординат – выставлен параметр бокового светорассеяния лазерного луча, который регистрирует гранулярность клетки. Б – Клетки, которые экспрессируют CD3+. Это Т-лимфоциты, накопившиеся в ходе сбора образца.



В

Г

**Рисунок 16 В, Г** – Анализ экспрессии маркеров в пределах популяции CD45+лимфоцитов. В – Популяция клеток, экспрессирующая маркер CD3 и CD4. Количество клеток CD3+ составляет 26,7%, а количество CD3+CD4+ Т-клеток составляет 42,93%. Г –Оценка экспрессии CD3+ Т-клетками еще одного маркера CD8. Количество Т-клеток, экспрессирующих CD8, в данном образце в пределах лимфоцитов составило 16,04%

### 2.3 Статистическая обработка

Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и  $\chi^2$ . Различия считали значимыми при  $p < 0,05$  (точность  $> 95\%$ ). Степень взаимосвязи параметров оценили с помощью корреляционного анализа по Спирмену.

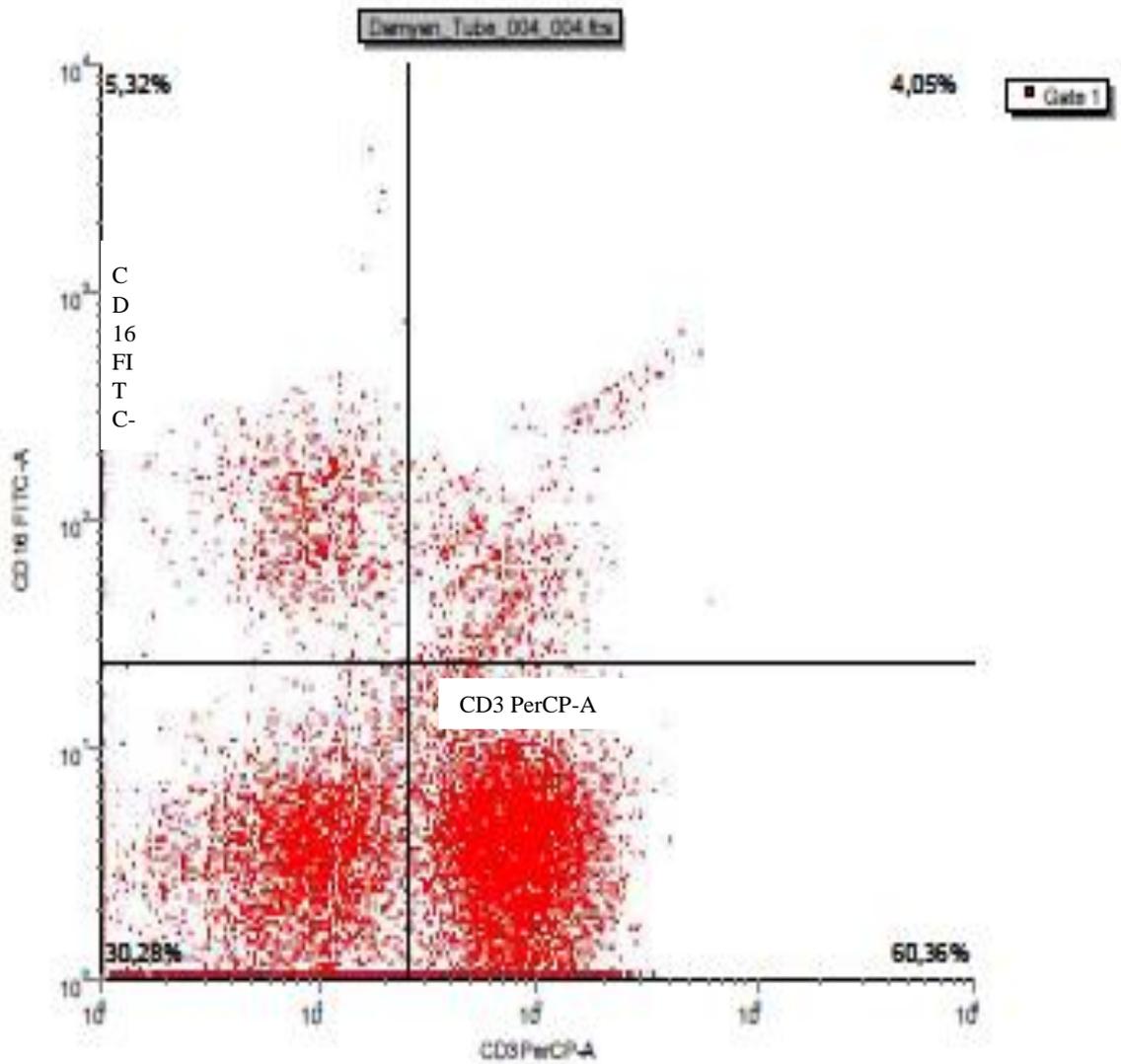
## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 НК-клетки КМ больных РМЖ

Одной из важных задач диссертационной работы явилось изучение показателей врожденного иммунитета на основании работы уровней субпопуляций лимфоидных клеток в КМ при РМЖ в сравнении с доброкачественными заболеваниями, а также изучение этих субпопуляций при РМЖ в зависимости от клинических и биологических особенностей опухоли.

Сравнение показателей при РМЖ и доброкачественных процессах в ней не выявило существенных различий. В качестве сравнения оценили уровни зрелых Т и В лимфоцитов КМ у больных РМЖ, которые также не различались. Из числа изученных субпопуляций, лишь уровни Т-клеток, экспрессирующих CD16, были несколько более высокими (различия близки к достоверным,  $p=0,055$ ) у больных РМЖ в сравнении с доброкачественными процессами в МЖ:  $3,4\pm 0,89\%$  ( $n=49$ ) и  $1,45\pm 0,4\%$  ( $n=9$ ),  $p=0,055$ . По остальным субпопуляциям различий не выявлено. Пример выраженной пропорции CD16+CD3+ клеток представлен на Рисунке 17.

Нами осуществлено сопоставление уровней НК-клеток с клиническими показателями у больных РМЖ. Не установлено различий в уровнях НК-клеток КМ в зависимости от размера опухоли, в частности, при проведении сравнения в наиболее многочисленных группах больных с индексами pT1 и pT2 (Таблица 7).



**Рисунок 17** – Данные в гейте лимфоцитов ( $CD45^{++}SSC^{low}$ ) КМ больной РМЖ с выраженной пропорцией  $CD16^{+}CD3^{+}$  клеток (4,05%). По оси абсцисс – экспрессия антигена CD3 (Т-клетки), по оси ординат – экспрессия антигена CD16

**Таблица 7** – Сравнительная оценка уровней НК-клеток КМ в зависимости от размера опухоли при РМЖ

Субпопуляции НК-клеток	T	N	M±m	p
CD16+CD3-	T1	20	12,3 ±1,7	0,75
	T2	17	13,04 ±1,6	
CD56+CD3-	T1	22	12,0±1,6	0,5
	T2	17	10,5±1,5	

Аналогичный анализ проведен в зависимости от наличия метастазов в лимфатические узлы, в частности, в наиболее многочисленных группах N0 и N1, (Таблица 8).

**Таблица 8** – Сравнительная оценка уровней НК-клеток КМ в зависимости от количества пораженных лимфатических узлов при РМЖ

Субпопуляции НК-клеток	N	n	M±m	p
CD16+CD3-	N1	28	12,1 ±1,5	0,63
	N2	9	12,0 ±1,9	
CD56+CD3-	N1	30	12,0±1,4	0,41
	N2	9	10,1±1,7	

Уровни НК-клеток в группах пациенток с отсутствием метастазов и с наличием таковых (N+) также не различались (Таблица 9).

**Таблица 9** – Сопоставление уровней НК-клеток КМ со стадиями РМЖ

Стадии РМЖ	Субпопуляции НК-клеток	M±m	p
Pa, Pb (n=17) Ia (n=16)	CD16+CD3-	12,5±1,7 12,6±2,0	0,98
Pa, Pb (n=17) Ia (n=18)	CD56+CD3-	10,2±1,6 12,4±2,0	0,38

Изучены уровни НК-клеток и сопоставлены со стадиями заболевания у пациенток при РМЖ. Не установлено достоверных различий в уровне костномозговых субпопуляций клеток врожденного иммунитета у больных РМЖ в зависимости от стадии заболевания, рецепторного статуса опухолевых клеток (рецепторы эстрогенов, прогестерона), а также наличия или отсутствия рецептора Her2/neu.

Следующим этапом мы оценили субпопуляционный состав лимфоцитов КМ у больных РМЖ в зависимости от индекса пролиферативной активности. Обнаружены интересные и достоверные связи содержания Т, Т/НК лимфоцитов в зависимости от уровней Ki-67. Результаты анализа представлены в Таблице 10.

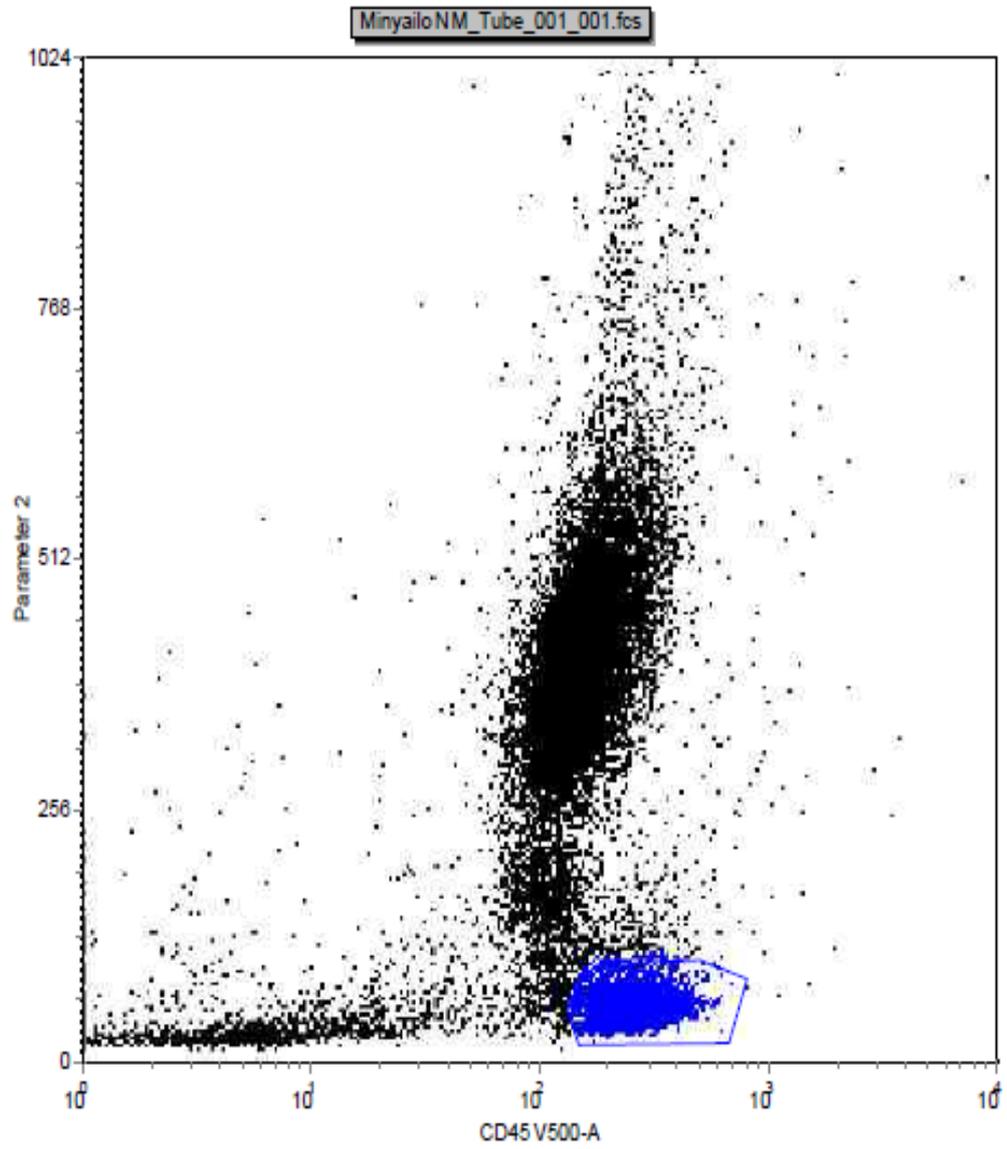
**Таблица 10** – Взаимосвязь субпопуляций клеток врожденного иммунитета в КМ с уровнем пролиферативной активности (Ki-67) опухоли при РМЖ

Субпопуляция лимфоцитов	KI67, %	n	M±m	p
CD56+CD16+ (%% среди НК-клеток)	≥ 20,00	6	77,4±4,2	0,021
	< 20,00	4	91,8±2,6	
CD16+CD3-	≥ 20,00	29	11,1±1,2	0,028
	< 20,00	17	15,8±1,8	
CD16+CD3+	≥ 20,00	18	2,4±0,4	0,045
	< 20,00	6	6,5±3,3	
CD56+CD3-	≥ 20,00	30	9,4±1,1	0,009
	< 20,00	18	14,6±1,6	
CD3+	≥ 20,00	32	63,0±2,0	NS
	< 20,00	19	62,0±1,6	

NS - различия статистически не значимы

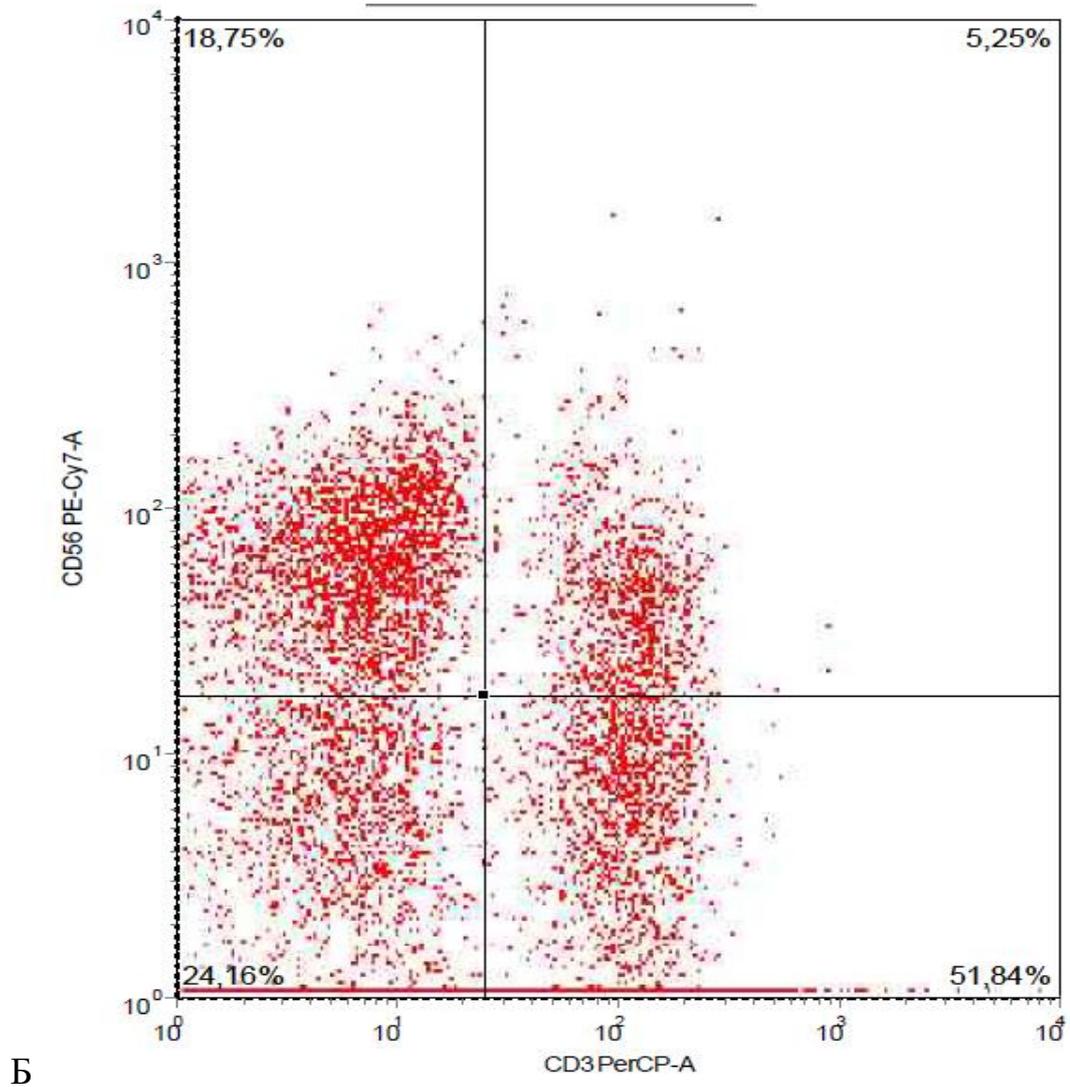
Как видно из Таблицы 10 уровни Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD16-рецептор, были достоверно более высокими у больных с низкой пролиферативной активностью клеток РМЖ. В качестве сравнения в Таблице 10 приведены уровни зрелых Т-лимфоцитов КМ у больных РМЖ, которые не различались в зависимости от индекса пролиферативной активности.

Уровни изученных субпопуляций НК-клеток (CD16+CD3-, CD56+CD3-) были достоверно более высокими у больных РМЖ с низким индексом пролиферативной активности (менее 20% Ki-67+ опухолевых клеток). Особенно существенные различия отмечены в отношении популяции CD56+CD3-лимфоцитов: 9,4% и 14,6%,  $p=0,009$ . Пример выраженной пропорции НК-клеток (CD56+CD3-) представлен на Рисунке 18 (А, Б).



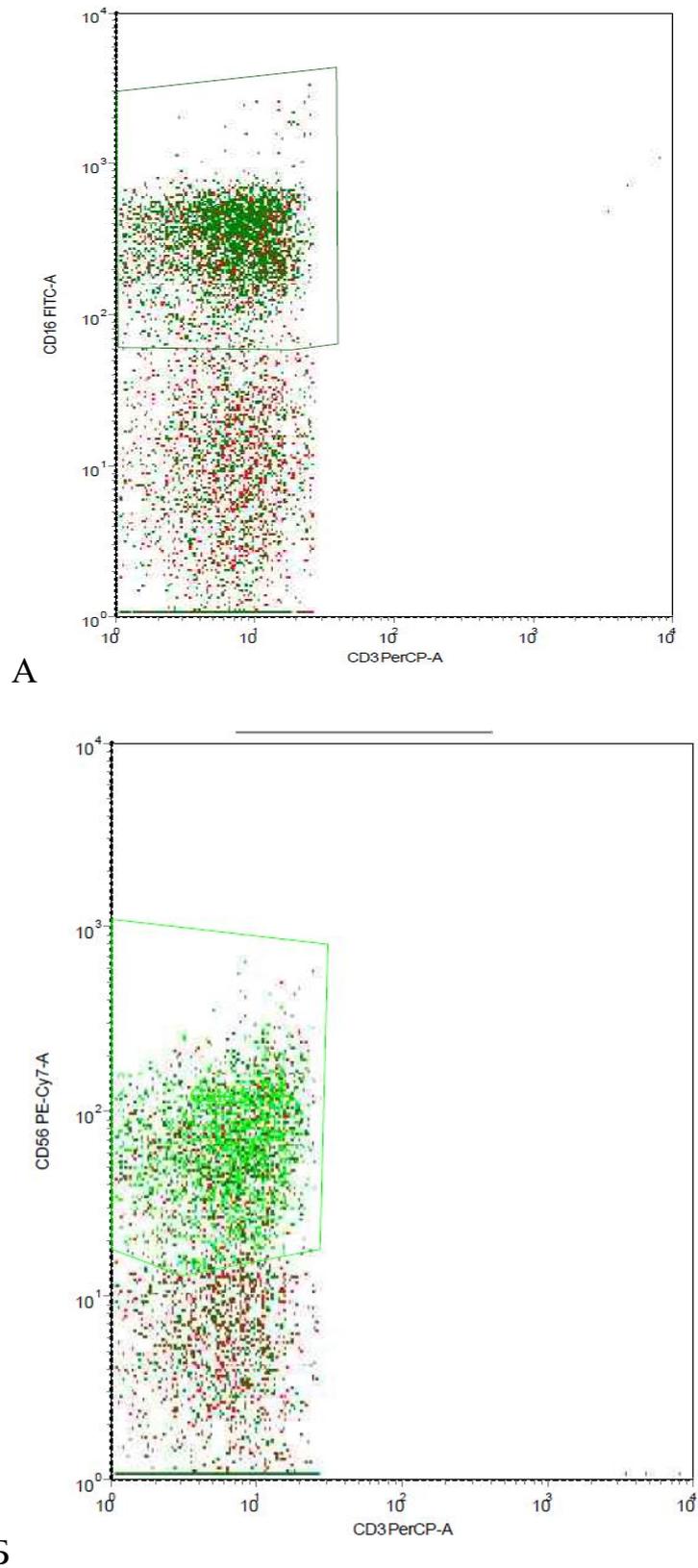
А

**Рисунок 18 А** – Выраженная пропорция НК-клеток (CD56+CD3-) у больной РМЖ. А – На рисунке CD56+CD3-клетки определены в гейте лимфоцитов.

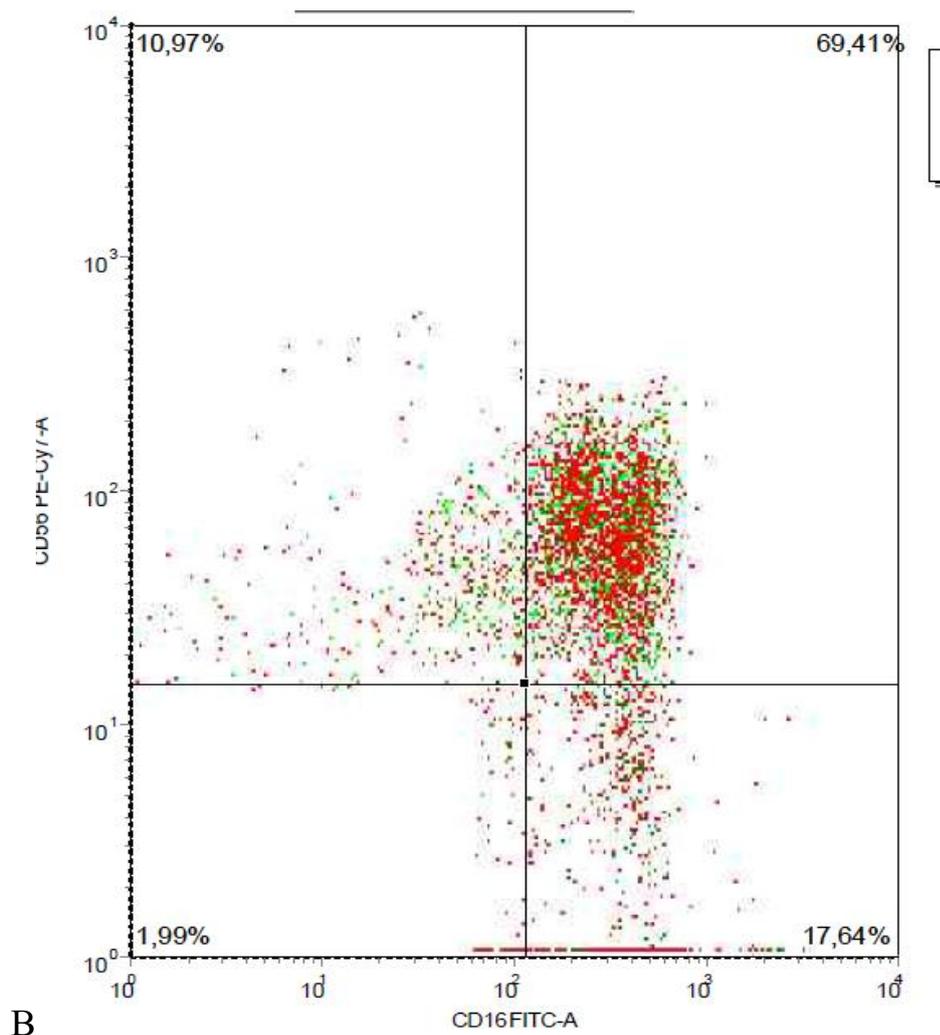


**Рисунок 18 Б** – Выраженная пропорция NK-клеток (CD56+CD3-) у больной РМЖ. Б – На рисунке в координатах CD56/CD3 NK-клетки составляют 18,75%

Интересно отметить, что популяция NK-клеток КМ, экспрессирующих оба маркера (CD16+CD56+CD3-), во всех случаях РМЖ была доминирующей среди NK-клеток, но достоверно преобладала при раке с низкой пролиферативной активностью (92% и 77%,  $p=0,021$ ). Это новая характеристика, которая ранее не была описана. Разумеется, количество наблюдений здесь невелико (6 и 4), и требуется продолжить набор материала для получения более достоверной информации. Пример популяции NK-клеток, коэкспрессирующих CD16 и CD 56 представлен на Рисунке 19.



**Рисунок 19 А, Б** – Пример коэкспрессии CD16 и CD56 на Т-клетках КМ больной РМЖ. Популяция НК-клеток, коэкспрессирующих CD56 и CD16, является преобладающей в пуле НК-клеток КМ больных РМЖ. А – гейт CD16+ НК-клеток, Б – гейт CD56+ НК-клеток



**Рисунок 19 В** – Пример коэкспрессии CD16 и CD56 на Т-клетках КМ больной РМЖ. Популяция НК-клеток, коэкспрессирующих CD56 и CD16, является преобладающей в пуле НК-клеток КМ больных РМЖ. В – объединение гейтов А и Б, в координатах CD16 - CD56

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

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

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

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

### 3.2 Костномозговые популяции клеток врожденного иммунитета (TCR $\gamma\delta$ -клетки, В1-лимфоциты) больных РМЖ

Мы изучили следующие популяции: TCR $\gamma\delta$ -лимфоциты и В1-лимфоциты (CD19 или CD20+, CD5+). Характеристика уровней клеток врожденного иммунитета на различных стадиях РМЖ представлена в таблице 11.

**Таблица 11** – Уровни костномозговых TCR $\gamma\delta$ -клеток и В-лимфоцитов (M $\pm$ m) при различных стадиях РМЖ

Стадия РМЖ	В1- лимфоциты		TCR $\gamma\delta$ - лимфоциты	
	(M $\pm$ m)	N	(M $\pm$ m)	N
0 - TisN0M0	$1,8 \pm 0,4$	2	$2,7 \pm 1,7$	2
IA - T1N0M0	$5,7 \pm 1,8$	17	$4,3 \pm 0,8$	18
IIa - T1N1M0	$12,4 \pm 10,7$	5	$4,1 \pm 1,1$	4

IIa - T2N0M0	6,8±3,7	9	3,9±0,7	9
IIb - T2N1M0	4,9±2,5	6	5,3±1,6	4
IIb - T3N0M0	6,2±0,2	2	2,6±0,4	2

Как видно из таблицы, некоторое преобладание TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов отмечено при IIb стадии (T2N1M0), однако в целом взаимосвязи уровней костномозговых TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов со стадией РМЖ не отмечено. Аналогичные сопоставления проведены для В1-лимфоцитов, здесь значительное, но не достоверное преобладание В1-клеток наблюдалось при IIa стадии.

При анализе клинических характеристик опухоли и костномозговых субпопуляций TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов и В1-лимфоцитов (CD19 или CD20+ CD5+) нами не установлено взаимосвязи показателей врожденного клеточного иммунитета с размером опухоли (Таблица 12). Несколько более высокие концентрации TCR $\gamma\delta$ - и В1-лимфоцитов отмечены при опухолях pT2, однако, различия были недостоверными.

**Таблица 12** – Взаимосвязь между размером первичной опухоли (pT) и уровнями TCR $\gamma\delta$ - и В1-лимфоцитов

Показатель	T	N	M±m	p
TCR $\gamma\delta$	T1	22	4,3±0,7	0,9
	T2	17	2,3±0,6	
В1	T1	22	7,3±2,7	0,8
	T2	19	6,8±1,97	

Далее мы оценили взаимосвязь показателей врожденного клеточного иммунитета с наличием метастазов в лимфатических узлах у больных РМЖ (Таблица 13).

**Таблица 13** – Взаимосвязь между индексом N и уровнями TCR $\gamma\delta$ - и B1-лимфоцитов у больных РМЖ

Показатель	N	n	M $\pm$ m	p
TCR $\gamma\delta$	N0	31	4,0 $\pm$ 0,5	0,9
	N+	17	4,1 $\pm$ 0,5	
B1	N0	30	5,9 $\pm$ 1,5	0,8
	N+	19	6,9 $\pm$ 2,9	

Не установлено связи с фактом поражения лимфатических узлов, а также с локализацией метастазов (подмышечные, подключичные, парастернальные). Не отмечено связи с количеством опухолевых узлов и их максимальным размером. Однако, следует отметить, что максимальные уровни клеток врожденного иммунитета в КМ отмечены при наличии двух пораженных лимфатических узлов. Так, для TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов соответствующие значения составили: 6,0 $\pm$ 0,84% (n=4) и 3,8 $\pm$ 0,5% (n=31), p=0,075. Для B1 лимфоцитов различия являются ещё более впечатляющими: 16,0 $\pm$ 10,2% (n=5) и 5,8 $\pm$ 1,6% (n=29), p=0,07. Хотя, количество больных с поражением двух лимфатических узлов невелико, совпадение данных по двум субпопуляциям клеток врожденного иммунитета и близкие к достоверным уровням значимости различий, между этой группой больных и пациентками, не имеющими метастазов в лимфатических узлах, позволяет задуматься о возможном напряжении врожденного иммунитета на этапе явного лимфогенного распространения опухоли за пределы первичного очага.

При сопоставлении уровней TCR $\gamma\delta$ -, B1-лимфоцитов с морфологическими характеристиками опухоли установлено следующее. Связь с гистологическим типом опухоли нами не отмечено, p=0,82 (для TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов) и p=0,44 (для B1-лимфоцитов). Аналогично отсутствовали взаимосвязи TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов и B1-лимфоцитов с рецепторным статусом опухоли, экспрессией Her2/neu и индексом пролиферации опухоли.

Следующим этапом работы было изучение уровней субпопуляций TCR $\gamma\delta$ - и В1-лимфоцитов при разных молекулярных подтипах РМЖ. Нами получены достоверные различия в уровнях В1- лимфоцитов при люминальном В Her2-негативном и люминальном В Her2-позитивном подтипах. Максимальное количество В1-клеток отмечены при Her2-позитивном РМЖ 10,2% (n=10) против 4,0% (n=20), p=0,032 (Таблица 14).

**Таблица 14** – Уровни клеток врожденного иммунитета при люминальных В подтипах РМЖ

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

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

В отношении популяции TCR $\gamma\delta$ -клеток различий в анализируемых группах РМЖ не получено. Уровни содержания TCR $\gamma\delta$ -клеток при обоих подтипах люминального В РМЖ были сопоставимы (4,0% и 4,6%).

Далее была выполнена оценка корреляционных связей с остальными субпопуляциями лимфоцитов КМ. Достоверные связи установлены только с CD5+ В-клетками: R=0,28; p=0,044; n=52. Эти данные получены при анализе всей популяции пациентов – больных РМЖ и больных с доброкачественными заболеваниями МЖ. Поэтому представляло интерес оценить отдельно наличие

корреляций в этих 2 группах. Действительно, у больных РМЖ корреляция между CD5+ В-лимфоцитами и TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитами отсутствовала ( $p>0,05$ ). Среди больных с доброкачественными заболеваниями (фиброаденома, фиброзно-кистозная мастопатия, аденоз молочной железы, внутрипротоковая папиллома), напротив, корреляционные связи между этими двумя субпопуляциями были очень высокими:  $R=0,757$ ;  $p=0,03$ ;  $n=8$ . Таким образом, при РМЖ между клетками врожденного иммунитета TCR $\gamma\delta$ - и В1-лимфоцитами в КМ утрачивается указанная корреляция (Таблица 15).

**Таблица 15** – Корреляционные связи TCR $\gamma\delta$ - и В1-лимфоцитов при РМЖ и доброкачественных заболеваниях

Пара маркеров	РМЖ	Доброкачественные заболевания
TCR $\gamma\delta$ – В1-лимфоциты	-	$R=0,757$ ; $p=0,03$ ; $n=8$
TCR $\gamma\delta$ – индекс созревания эритроидных клеток	-	$R=-0,688$ ; $p=0,04$ ; $n=9$
В1-лимфоциты - плазмоциты	$R=0,409$ ; $p=0,004$ ; $n=48$	-
В1-лимфоциты - моноциты	-	$R=-0,953$ ; $p=0,002$ ; $n=9$

Вместе с тем, важно иметь в виду, что несмотря на высокие коэффициенты корреляции и достоверность взаимосвязи, количество больных в группе сравнения с доброкачественными процессами невелико (10 пациенток), и поэтому необходимо дальнейшее накопление материала.

Следующим этапом работы было сопоставление уровней клеток врожденного иммунитета при РМЖ и доброкачественных заболеваниях с показателями миелограммы (Таблица 16). Как видно из таблицы, корреляционные связи TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов с клеточными типами и индексами, выделяемыми в миелограмме, в целом по группе изученных пациенток отсутствовали. Аналогичным образом, отсутствовали соответствующие связи у больных РМЖ. Интересно отметить, что при доброкачественных заболеваниях МЖ установлена

обратная достоверная корреляционная связь TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов с индексом созревания эритроидных клеток: R=-0,688; p=0,04; n=9.

**Таблица 16** – Корреляционные связи TCR $\gamma\delta$ - и В1-лимфоцитов с показателями миелограммы при РМЖ и доброкачественных заболеваниях

Пара маркеров	РМЖ	Доброкачественные заболевания
TCR $\gamma\delta$ - индекс созревания эритроидных клеток	-	R= - 0,688; p=0,04; n=9
В1-лимфоциты – эозинофильные миелоциты	R= 0,331; p=0,012; n=57	-
В1-лимфоциты-плазматические клетки	R=0,399; p=0,002; n=57	-
В1- лимфоциты – моноциты	-	R=-0,953; p=0,002; n=9.

В целом, по обследованной группе наблюдалась достоверная корреляционная связь В1(CD5+)-лимфоцитов с эозинофильными миелоцитами (R=0,331; p=0,012; n=57), а также с плазматическими клетками (R=0,399; p=0,002; n=57). У пациенток со сниженным или нормальным содержанием сегментоядерных нейтрофилов отмечены достоверно более высокие уровни этих клеток (CD5+ В-лимфоцитов) в сравнении со случаями повышения сегментоядерных нейтрофилов: 8,1±1,8% (n=39) и 2,0±0,5% (n=19); p=0,002. У больных РМЖ отмечены те же взаимосвязи: для эозинофильных миелоцитов R=0,365; p=0,011; n=48; для плазматических клеток R=0,409; p=0,004; n=48. Средние уровни CD5-позитивных В-лимфоцитов также были достоверно более высокими при нормальных или сниженных значениях сегментоядерных нейтрофилов в сравнении со случаями повышения этих клеток: 8,5±2,0% (n=33) и 1,7±0,47% (n=16), p=0,003. Указанные корреляции не наблюдались у пациенток с доброкачественными заболеваниями: единственная высоко достоверная обратная

корреляционная связь популяции CD5+ В-лимфоцитов установлена с количеством моноцитов:  $R=-0,953$ ;  $p=0,002$ ;  $n=9$ .

Таким образом, установлены достоверные взаимосвязи В1(CD5+)-лимфоцитов с клетками миелоидного ряда. Взаимосвязи TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов с показателями миелограммы не установлено.

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

При проведении данного анализа нами были исключены случаи с явным разбавлением КМ периферической кровью, суммарным содержанием клеток эритроидного роста менее 5%. Характеристика взаимосвязей различных клеточных типов с нормальными значениями представлена в Таблице 17.

**Таблица 17** – Взаимоотношения различных типов клеток гранулоцитарного роста, выделяемых в миелограмме больных РМЖ, с уровнями этих клеток в норме

Клеточный тип	Показатель	Количество	%
Промиелоциты	Повышены	0	0
	Снижены	53	88,3
	Норма	7	11,7
Нейтрофильные Миелоциты	Повышены	13	21,3
	Снижены	5	8,2
	Норма	43	70,5
Нейтрофильные метамиелоциты	Повышены	0	0
	Снижены	20	32,8
	Норма	41	67,2
Палочкоядерные нейтрофилы	Повышены	15	24,6
	Снижены	1	1,6
	Норма	45	73,8
Сегментоядерные нейтрофилы	Повышены	18	29,5
	Снижены	3	4,9
	Норма	40	65,6
Эозинофильные миелоциты	Повышены	2	3,3
	Снижены	1	1,6
	Норма	57	95,0
Эозинофильные палочкоядерные	Повышены	12	19,7
	Снижены	1	1,6
	Норма	47	77

Эозинофильные сегментоядерные	Повышены	3	4,9
	Снижены	0	0
	Норма	58	95,1
Базофильные Сегментоядерные	Повышены	5	8,6
	Снижены	3	5,2
	Норма	50	86,2
Все клетки гранулоцитарного ростка	Повышены	26	42,6
	Снижены	4	6,6
	Норма	31	50,8
Индекс созревания нейтрофилов	Повышены	1	1,6
	Снижены	32	52,5
	Норма	28	45,9

Обобщая данные, представленные в таблице 17, следует отметить 2 основных момента – снижение предшественников гранулоцитарного ряда (промиелоцитов – в 88,3%, метамиелоцитов – в 32,8%), а также индекса созревания нейтрофилов – в 52,5%. Повышение уровней отмечалось для зрелых гранулоцитов – 29,5%, а также всех клеток гранулоцитарного ростка – в 42,6%. Как мы уже отмечали, случаи с явным разбавлением кровью (n=3) были исключены из анализа ввиду их малого числа для статистического анализа.

Во-первых, мы провели сопоставление данных морфологического анализа клеток гранулоцитарного ростка в миелограмме с клиническими показателями у больных РМЖ.

#### **Сопоставление уровней клеток гранулоцитарного ростка с клиническими данными**

Для опухолей различного размера провели сопоставления уровней каждого из клеточных типов гранулоцитарного ростка с размером опухоли (pT), метастатическим поражением лимфатических узлов (pN) и стадией заболевания (Таблица 18).

**Таблица 18** – Взаимосвязь между размером опухоли (pT) и уровнем промиелоцитов КМ

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

Как видно из Таблицы 18, наибольшая частота случаев с нормальным содержанием промиелоцитов (20,8%) наблюдалась при малом размере опухолей (pT1), в то время как при опухолях большего размера эта величина снижалась до 3,6% (при pT2) и 0% (при pT3). В то же время различия находятся на грани достоверности и лишь при использовании критерия линейно-линейной связи достоверны ( $p=0,045$ ).

При анализе уровней нейтрофильных метамиелоцитов достоверной связи с размером опухоли (pT) не установлено ( $p=0,84$ ). Ещё одним показателем в пределах гранулоцитарного ростка КМ, который был сниженным у больных РМЖ, является индекс созревания нейтрофилов. Проанализировали взаимосвязь этого признака с размером первичной опухоли (pT) (Таблица 19).

**Таблица 19** – Взаимосвязь между уровнями нейтрофильных метамиелоцитов и индекса созревания нейтрофилов КМ больных РМЖ и размером опухоли (pT)

Индекс T	Нейтрофильные метамиелоциты		Индекс созревания нейтрофилов		Итого
	понижен	норма	понижен	Норма	
T1	7(29,2%)	17(70,8%)	12(50%)	12(50,0%)	24 (100%)
T2	10(35,7%)	18(64,3%)	15(53,6%)	13(46,4%)	28(100%)
T3	1(25,0%)	3(75,0%)	3(75%)	1(25,0%)	4(100%)
Итого	18(32,1%)	38(67,9%)	30(53,6%)	26(46,4%)	56(100%)

Взаимосвязи с данным показателем нами не установлено,  $p$  по Хи-квадрат = 0,65.

Среди клеточных элементов КМ больных РМЖ в значительном числе случаев были повышены уровни сегментоядерных нейтрофилов и суммарное содержание клеток гранулоцитарного ростка. При анализе взаимосвязи между размером первичной опухоли и уровнями сегментоядерных нейтрофилов статистически значимых различий не установлено, так же, как и в отношении суммарного числа клеток гранулоцитарного ростка;  $p$  (по Хи-квадрат) = 0,28 и 0,22, соответственно. Данные представлены в таблице 20.

**Таблица 20** – Взаимосвязь между уровнем сегментоядерных нейтрофилов и суммарным содержанием клеток гранулоцитарного ряда в КМ больных РМЖ и размером опухоли (pT)

Индекс Т	Сегментоядерные нейтрофилы			Все клетки гранулоцитарного ростка			Итого
	повышен	понижен	норма	повышен	понижен	Норма	
T1	7(29,2%)	1(4,2%)	16(66,7%)	11(45,8%)	1(4,2%)	12(50,0%)	24(100%)
T2	6(21,4%)	2(7,1%)	20(71,4%)	10(35,7%)	2(7,1%)	16(57,1%)	28(100%)
T3	3(75%)	0(0%)	1(25,0%)	3(75,0%)	1(25,0%)	0(0%)	4(100%)
Итого	16(28,6%)	3(5,4%)	37(66,1%)	24(42,9%)	4(7,1%)	28(50,0%)	56(100%)

Следующим разделом клинического анализа была оценка взаимосвязи клеток гранулоцитарного ростка КМ больных РМЖ с наличием метастатического поражения лимфатических узлов. Эти данные представлены в таблице 21.

**Таблица 21** – Взаимосвязь между содержанием промиелоцитов и нейтрофильных метамиелоцитов в КМ больных РМЖ и наличием специфически пораженных лимфатических узлов (N)

Поражение лимфатических узлов (N)	Промиелоциты		Нейтрофильные метамиелоциты		Итого
	понижены	Норма	понижены	норма	
N0	33(89,2%)	4(10,8%)	11(29,7%)	26(70,3%)	37(100%)
N1	13(92,9%)	1(7,1%)	7(50,0%)	7(50,0%)	14(100%)
N2	4(80,0%)	1(20%)	0(0%)	5(100%)	5(100%)
N3	1(100%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	1(100%)
Итого	51(89,5%)	6(10,5%)	18(31,6%)	39(68,4%)	57(100%)

Как видно из таблицы, специфической связи между данными признаками не установлено ( $p=0,857$ ). Следует отметить, однако, что при индексе рN0 нормальные уровни метамиелоцитов имели место в 70,3% случаев, в то время как пониженные – в 29,7%. Вместе с тем, как уже отмечено, достоверная связь между признаками отсутствовала.

Индекс созревания нейтрофилов был снижен в половине случаев. Данные по сопоставлению этого признака с поражением лимфатических узлов представлены в таблице 22.

**Таблица 22** – Взаимосвязь между индексом созревания нейтрофилов в КМ больных РМЖ и наличием специфически пораженных лимфатических узлов (рN)

Индекс N	Индекс созревания нейтрофилов		Итого
	Снижен	норма	
N0	18(48,6%)	19(51,4%)	37(100%)
N1	8(57,1%)	6(42,9%)	14(100%)
N2	4(80,0%)	1(20,0%)	5(100%)
N3	0(0%)	1(100%)	1(100%)
Итого	30(52,6%)	27(47,4%)	57(100%)

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что по мере нарастания поражения лимфатических узлов от pN0 до pN2 сниженный индекс созревания нейтрофилов наблюдался чаще 48,6% - 57,1% - 80%. Данные по pN3 можно, по-видимому, не учитывать, так как в этой группе только одно наблюдение. Вместе с тем, достоверных данных не получено,  $p=0,397$ . Это может быть обусловлено, в частности, малочисленностью некоторых групп.

Ещё 2 показателя гранулоцитарного ростка (уровень сегментоядерных нейтрофилов и общее содержание клеток гранулоцитарного ростка) у больных РМЖ были в значительном проценте случаев повышенными в сравнении с нормой (Таблица 23).

**Таблица 23** – Взаимосвязь между уровнем сегментоядерных нейтрофилов и суммарным содержанием клеток гранулоцитарного ростка в КМ больных РМЖ и наличием специфически пораженных лимфатических узлов (pN)

Индекс N	Сегментоядерные нейтрофилы			Все клетки гранулоцитарного ростка			Итого
	Понижен	норма	повышен	повышен	понижен	норма	
N0	11 (29,7%)	3(8,1%)	23(62,2%)	15(40,5%)	4(10,8%)	18(48,6%)	37(100%)
N1	3(21,4%)	0(0%)	11(78,6%)	4(28,6%)	0(0%)	10(71,4%)	14(100%)
N2	2(40,0%)	0(0%)	3(60%)	4(80,0%)	0(0%)	1(20,0%)	5(100%)
N3	0(0,0%)	0(0%)	1(100%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)
Итого	16(28,1%)	3(5,3%)	38(66,7%)	24(42,1%)	4(7%)	29(50,9%)	57(100%)

Как видно из представленных в таблице данных уровни сегментоядерных нейтрофилов КМ не были взаимосвязаны с поражением лимфатических узлов у больных РМЖ,  $p=0,806$ . При этом интересно отметить, что наличия метастазов в лимфоузлах случаи нормального содержания сегментоядерных нейтрофилов отсутствовали: содержание этих клеток в образцах КМ было либо снижено, либо повышено. Достоверной взаимосвязи между наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах и уровнями суммарного количества клеток гранулоцитарного ростка в КМ больных РМЖ установить не удалось ( $p=0,234$ ).

### Анализ взаимосвязи клеток гранулоцитарного ростка КМ со стадией заболевания

Следующим разделом нашей работы явился анализ взаимосвязи клеток гранулоцитарного ростка КМ со стадией заболевания. Оценивались показатели гранулоцитарного ростка миелограммы, которые имели наибольшие отклонения от нормы у больных РМЖ. Данные по сопоставлению с уровнями промиелоцитов и нейтрофильных метамиелоцитов представлены в таблице 24.

**Таблица 24** – Сопряженность признаков: стадия заболевания – промиелоциты, нейтрофильные метамиелоциты у больных РМЖ

Стадия РМЖ	Промиелоциты		Нейтрофильные метамиелоциты		Итого
	Снижен	норма	снижен	Норма	
Ia – T1N0M0	15(79,0%)	4(21,1%)	4(21,1%)	15(78,9%)	19(100%)
IIa – T1N1M0	8(88,9%)	1(11,1%)	3(33,3%)	6(66,7%)	9(100%)
IIa – T2N0M0	11(100%)	0(0%)	6(54,5%)	5(45,5%)	11(100%)
IIb - T2N1M0	8(100%)	0(0%)	4(50,0%)	4(50,0%)	8(100%)
Итого	42(89,4%)	5(10,6%)	17(36,2%)	30(63,8%)	47(100%)

Следует отметить, что наблюдается четкая тенденция по нарастанию процента сниженной пропорции промиелоцитов в КМ от стадии Ia к стадии IIb от 79% до 100%. Вместе с тем, не все статистические оценки подтверждали существование данной закономерности: Хи-квадрат  $p=0,218$ ; отношение правдоподобия  $p=0,111$ ; линейно-линейная связь  $p=0,046$ . Сходная тенденция отмечена в отношении нейтрофильных метамиелоцитов, однако, в этом случае значение  $p$  по критерию линейно-линейной связи было недостоверным,  $p=0,06$ .

Что же касается индекса созревания нейтрофилов, то здесь достоверной связи не установлено ( $p=0,503$ ). Уровни сегментоядерных нейтрофилов не были взаимосвязаны со стадией заболевания ( $p=0,682$ ). Данные представлены в таблице 25.

**Таблица 25** – Сопряженность признаков: стадия заболевания- индекс созревания нейтрофилов и уровень сегментоядерных нейтрофилов в КМ у больных РМЖ

Стадия РМЖ	Индекс созревания нейтрофилов		Сегментоядерные нейтрофилы			Итого
	снижен	норма	повышен	снижен	Норма	
Ia– T1N0M0	9(47,4%)	10(52,6%)	6(31,6%)	1(5,3%)	12(63,2%)	19(100%)
IIa-T1N1M0	3(33,3%)	6(66,7%)	1(11,1%)	1(11,1%)	7(77,8%)	9(100%)
IIa– T2N0M0	7(63,6%)	4(36,4%)	4(36,4%)	1(9,1%)	6(54,5%)	11(100%)
IIb– T2N1M0	5(62,5%)	3(37,5%)	1(12,5%)	0(0%)	7(87,5%)	8(100%)
Итого	24(51,1%)	23(48,9%)	12(25,5%)	3(6,4%)	32(68,1%)	47(100%)

Также нами было проведено сопоставление суммарного содержания клеток гранулоцитарного ростка в КМ больных РМЖ со стадией заболевания (Таблица 26).

**Таблица 26** – Сопряженность суммарного содержание клеток гранулоцитарного ростка в КМ у больных РМЖ

Стадия заболевания	Все клетки гранулоцитарного ростка			Итого
	повышен	снижен	норма	
Ia – T1N0M0	10(52,6%)	1(5,3%)	8(42,1%)	19(100%)
IIa- T1N1M0	2(22,2%)	2(22,2%)	5(55,6%)	9(100%)
IIa – T2N0M0	3(27,3%)	0(0%)	8(72,7%)	11(100%)
IIb – T2N1M0	2(25,0%)	0(0%)	6(75,0%)	8(100%)
Итого	17(36,2%)	3(6,4%)	27(57,4%)	47(100%)

При анализе взаимосвязи суммарного содержания клеток гранулоцитарного ростка со стадией заболевания выявилась интересная тенденция – минимальное содержание случаев с нормальным уровнем гранулоцитов отмечено при Ia стадии за счет того, что именно при Ia стадии отмечалась наибольшая частота повышения данного признака (52,6%). Вместе с тем, эти данные можно рассматривать лишь как некую тенденцию, так как достоверность связи отсутствовала,  $p=0,073$  (линейно-линейная связь).

Таким образом, нами установлена определенная связь между гранулоцитопозом и стадией РМЖ. Эта взаимосвязь реализуется в основном на уровне клеток-предшественников – промиелоцитов и метамиелоцитов, содержание которых при нарастании стадии заболевания снижается. Иными словами, при нарастании стадии заболевания происходит угнетение начальных этапов гранулоцитопоза.

#### **Взаимосвязь показателей гранулоцитопоза с патоморфологическими характеристиками РМЖ и рецепторным статусом**

Мы провели сравнение средних уровней молодых форм гранулоцитов, зрелых гранулоцитов, а также индекса созревания нейтрофилов при различных морфологических вариантах РМЖ. В анализ были включены инвазивный протоковый и инвазивный дольковый рак. Результаты выполненного анализа представлены в таблице 27. Данные таблицы свидетельствуют, что различий по средним уровням содержания клеточных элементов гранулоцитарного ростка в анализируемых образцах КМ при протоковом и дольковом типе РМЖ не получены. Также не получено различий и в отношении индекса созревания нейтрофилов.

**Таблица 27** – Взаимосвязь между показателями гранулоцитопоза и гистологическим типом РМЖ

Клеточный тип	Гистологический вариант опухоли	n	$M \pm m$	p
Промиелоциты	Протоковый рак	44	$0,4 \pm 0,07$	0,501
	Дольковый рак	5	$0,4 \pm 0,7$	

Нейтрофильные метамиелоциты	Протоковый рак	44	8,5±0,3	0,27
	Дольковый рак	5	9,8±1,0	
Индекс созревания нейтрофилов	Протоковый рак	44	0,5±0,04	0,99
	Дольковый рак	5	0,5±0,07	
Сегментоядерные нейтрофилы	Протоковый рак	44	21,8±0,9	0,59
	Дольковый рак	5	20,3±2,3	
Все клетки гранулоцитарного ростка	Протоковый рак	44	65,8±1,1	0,46
	Дольковый рак	5	63,9±2,1	

Следующим этапом стало изучение взаимосвязи показателей гранулоцитарного роста анализируемых образцов КМ со степенью злокачественности РМЖ. Результаты сравнения средних уровней содержания клеточных типов, а также индекса созревания нейтрофилов при разных степенях злокачественности представлены в таблице 28. Средние уровни всех анализируемых показателей не отличались.

**Таблица 28** – Взаимосвязь между показателями гранулоцитопоза и степенью злокачественности РМЖ

Клеточный тип	G (степень злокачественности)	n	M ± m	p
Промиелоциты	2,3	55	0,4±0,06	0,81
	1	6	0,5±0,2	
Нейтрофильные метамиелоциты	2,3	55	8,6±0,3	0,74
	1	6	9,2±1,5	
Индекс созревания нейтрофилов	2,3	55	0,5±0,02	0,809
	1	6	0,5±0,07	

Сегментоядерные нейтрофилы	2,3	55	21,7±0,8	0,78
	1	6	20,3±2,05	
Все клетки гранулоцитарного ростка	2,3	55	66,8±0,9	0,13
	1	6	64,8±3,1	

Далее нами проводилось изучение средних значений уровня содержания клеток гранулоцитарного ростка, а также индекса созревания нейтрофилов в зависимости от индекса пролиферативной активности клеток РМЖ. Проанализированные данные приведены в таблице 29.

**Таблица 29** – Средние значения показателей гранулоцитарного роста в КМ больных РМЖ в зависимости от уровня пролиферативной активности опухолевых клеток

Клеточный тип	Ki67(%)	N	M ± m	p
Промиелоциты	≥20%	37	0,5±0,08	0,099
	<20%	24	0,3±0,08	
Нейтрофильные метамиелоциты	≥20%	37	8,5±0,4	0,35
	<20%	24	9,0±0,5	
Индекс созревания нейтрофилов	≥20%	37	0,5±0,02	0,74
	<20%	24	0,5±0,04	
Сегментоядерные нейтрофилы	≥20%	37	20,8±1,0	0,27
	<20%	24	22,7±1,3	
Все клетки гранулоцитарного роста	≥20%	37	64,6±1,0	0,17
	<20%	24	67,3±1,6	

Как видно из представленной таблицы, выполненное нами сравнение указанных параметров не установило статистически значимых различий. Средние значения показателей гранулоцитарного роста были сопоставимы при двух разных интервалах Ki 67  $\geq 20\%$  и  $< 20\%$ .

Представляло интерес оценить наличие связи между рецепторным статусом опухоли, содержанием молодых, а также зрелых форм гранулоцитов, анализируемых образцов КМ при РМЖ. В таблице 30 представлены данные проведенного анализа в отношении показателей гранулоцитарного роста и уровней рецепторов эстрогена в опухолевой ткани. Ни по одному из перечисленных показателей не установлено достоверных связей с уровнем рецептора эстрогена при РМЖ.

**Таблица 30** – Сопряженность уровня рецепторов эстрогена с уровнем промиелоцитов, нейтрофильных метамиелоцитов, индексом созревания нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов и суммой клеток гранулоцитарного роста в КМ у больных РМЖ

		n	M±m	p
Промиелоциты	снижен	53	4,8±0,4	0,36
	норма	7	3,3±1,5	
Нейтрофильные метамиелоциты	снижен	19	5,4±0,7	0,24
	норма	41	4,3±0,5	
Индекс созревания нейтрофилов	снижен	31	4,3±0,6	0,52
	норма	28	4,9±0,6	
Сегментоядерные нейтрофилы	повышен	17	4,6±0,8	0,87
	норма	40	4,8±0,5	
Все клетки гранулоцитарного роста	повышен	25	4,8±0,7	0,93
	норма	31	4,7±0,6	

Аналогичные сопоставления были проведены в отношении уровня содержания промиелоцитов, нейтрофильных метамиелоцитов, индекса созревания нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов в КМ у больных РМЖ с выраженностью экспрессии рецептора прогестерона. Результаты проведенного анализа отображены в таблице 31. Взаимосвязи изучаемых показателей в анализируемых образцах КМ больных РМЖ с выраженностью экспрессии рецептора прогестерона не выявлено.

**Таблица 31** – Сопряженность уровня рецептора прогестерона с показателями гранулоцитарного ростка КМ у больных РМЖ

		n	M±m	p
Промиеоциты	снижен	53	4,0±0,4	0,61
	норма	7	3,1±1,5	
Нейтрофильные метамиелоциты	снижен	19	4,7±0,7	0,17
	норма	41	3,5±0,5	
Индекс созревания нейтрофилов	снижен	31	3,7±0,6	0,76
	норма	28	4,0±0,6	
Сегментоядерные нейтрофилы	повышен	17	3,6±0,7	0,58
	норма	40	4,1±0,6	
Все клетки гранулоцитарного ростка	повышен	25	3,7±0,6	0,48
	норма	31	4,7±0,6	

Далее нами были изучены уровни экспрессии рецептора Her2/neu на клетках РМЖ в зависимости от содержания различных клеточных типов гранулоцитарного ростка. Результаты выполненного анализа приведены в таблице 32. Интересные данные получены в случаях отсутствия экспрессии рецептора Her2/neu на клетках РМЖ.

**Таблица 32** – Уровень экспрессии рецептора Her2/neu на клетках РМЖ в зависимости от содержания различных типов клеток гранулоцитарного ряда в КМ

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

Достоверно более низкие уровни нейтрофильных метаиелоцитов в анализируемых образцах КМ наблюдаются при выраженной экспрессии рецептора Her2/neu (≥2) опухолевыми клетками, 8,3±0,4 (n=42) и 9,6±0,5 (n=19), p=0,043, а также индекса созревания нейтрофилов, 0,4±0,02 (n=42) и 0,5±0,03 (n=19), p=0,005. В то же время средние значения уровней сегментоядерных нейтрофилов в случаях Her2/neu позитивного РМЖ были повышены, однако, статистически значимых различий не достигнуто (22,5±1,0 и 19,5±1,1) p=0,052.

Завершая написание данного раздела, важно отметить, что в работе установлены достоверные взаимосвязи между показателями гемопоэза (гранулоцитарный росток) и клинико-морфологическими характеристикам опухолевого процесса.

При характеристике гранулоцитопоза у больных РМЖ было впервые установлено, что наименее зрелые клетки гранулоцитарного ростка – промиелоциты и метаиелоциты – снижены у значительной части больных:

промиелоциты – у 88,3% больных, метамиелоциты – у 32,8% больных, снижен также индекс созревания нейтрофилов у 52,5% больных. Вместе с тем, отмечалось повышение уровня зрелых гранулоцитов у 29,5% больных, а также суммарного содержания клеток гранулоцитарного ростка у 42,6% больных.

Частота снижения уровней промиелоцитов нарастала при увеличении размеров опухоли pT1-pT2-pT3 (79,2%-96,4%-100%), а также с возрастанием стадии заболевания Ia-IIa-IIb (р /линейно-линейная связь/ – 0,046).

Экспрессия рецептора Her2/neu ассоциировалась с более низкими уровнями нейтрофильных миелоцитов и индексом созревания клеток гранулоцитарного ряда (р=0,043 и р=0,005), уровни сегментоядерных нейтрофилов в этих случаях были несколько более высокими (р=0,052).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучению особенностей иммунитета уделяется много внимания, поскольку понимание иммунологического реагирования организма онкологического больного является ключом к эффективной терапии рака. Многочисленные исследования посвящены изучению противоопухолевого ответа при РМЖ. Они касаются анализа циркулирующих и опухолю-инфильтрирующих иммунокомпетентных клеток. В последнее десятилетие предметом пристального интереса онкологов стал врожденный иммунитет. Роль этого звена противоопухолевого ответа доказана при саркомах [3, 7], раке желудка [104], меланоме и целом ряде других опухолей. Следует согласиться, что эффекторы врожденного иммунитета занимают одно из центральных мест в противоопухолевой защите. К ним относятся NK-клетки, CD5+В-лимфоциты, TCR $\gamma/\delta$ -лимфоциты, а также миелоидные (гранулоциты, моноциты) клетки.

В нашей работе были детально проанализированы уровни костномозговых популяций клеток врожденного иммунитета при РМЖ. Исследована их взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками опухоли и миелоидными клетками КМ.

Первым разделом нашей работы стал иммунофенотипический анализ популяций NK-клеток. Известно, что NK-клетки осуществляют контроль за ростом опухоли на всех этапах ее развития, включая метастазирование. Они обеспечивают быстрый эффекторный ответ, для реализации которого не нужны предварительная иммунизация и представление антигена в комплексе с молекулами ГКГ. Их цитолитическая активность реализуется с помощью особых белков: перфоринов и гранзимов, а также посредством рецепторов TRAIL и FasL. Наличие CD16 обеспечивает реализацию антителозависимой клеточной цитотоксичности [224]. NK-клетки вырабатывают различные цитокины про- и противовоспалительного характера, факторы роста и хемокины [139]. Иммунофенотипические характеристики субпопуляции NK-клеток у онкологических больных различаются, что находит отражение в их функциональной активности. Так, опухоль-инфильтрирующие NK-клетки

немелкоклеточного рака легкого характеризовались слабой экспрессией или полным отсутствием антигенов CD57, DNAM, NKp30 NKG2A. В то время как экспрессия рецептора CD127 была отчетливой, и увеличение пропорции этой субпопуляции ассоциировалось с прогрессией опухоли [117].

NK-клетки возникают из предшественника в КМ и характеризуются экспрессией CD56+CD94+/-NKG2A/C-KIR-. Высокие уровни экспрессии CD56++ отражают этап дифференцировки, на котором NK-клетки пока не экспрессируют CD16 и характеризуются как NKG2A+, NKG2C+/-, KIR-. Дальнейшая дифференцировка приводит к появлению CD16; NKG2A+NKG2C+/-KIR+/- . Уровни экспрессии антигена CD56 ослабевают. Следующим этапом приобретает разнообразие KIR: клетки по-прежнему экспрессируют CD16, утрачивается NKG2A; NKG2C+/-, KIR рецепторы стабильно экспрессированы (KIR+). Завершает процесс дифференцировки NK-клеток появление адаптивных NKG2C++ клеток. Эти клетки экспрессируют CD16, являются NKG2A-iKIR+. Это этап клональной экспансии и выживания NK-клеток [133].

NK-клетки КМ больных РМЖ, охарактеризованные нами в данной работе, были в основном достаточно зрелыми клетками, коэкспрессирующими CD56 и CD16. Обращало внимание, что пропорция CD56+CD16+клеток была во всех случаях преобладающей среди NK-клеток. Это новый факт, который ранее не был описан и требует дальнейшего изучения.

Не менее интересным фактом стало обнаружение достоверной связи содержания Т, Т/NK лимфоцитов в зависимости от уровней Ki-67. Нами отмечено содержание в КМ выраженного количества NK клеток, коэкспрессирующих CD56 и CD16, у больных РМЖ с низким индексом пролиферативной активности опухолевых клеток. По мере нарастания пролиферативной активности клеток РМЖ содержание субпопуляции CD56+CD3- и CD16+ CD3-клеток снижалось. Мы полагаем, что такой параллелизм, возможно, объясняется коэкспрессированием CD56 и CD16 на клеточной поверхности NK-клеток КМ больных РМЖ. Учитывая то, что уровни индекса пролиферативной активности злокачественных клеток отражают степень агрессивности опухолевого процесса,

выявленные нами изменения уровня NK-клеток становятся интересным аспектом поскольку порождают вопрос. Означает ли, что по мере прогрессии РМЖ уровни эффекторных CD16-позитивных NK-клеток снижаются? Этот вопрос требует дальнейшего изучения содержания популяции костномозговых CD16-позитивных NK-клеток при РМЖ.

В отношении субпопуляции Т/NK лимфоцитов установлено снижение уровня только CD16 экспрессирующих Т-клеток (CD16+CD3+), которые преобладали у больных РМЖ с низким индексом пролиферативной активности. Увеличение уровней индекса пролиферативной активности клеток РМЖ наблюдалось при уменьшении пропорции популяции CD16+CD3+ клеток.

Важным и интересным стало проведение анализа уровней субпопуляций NK лимфоцитов во взаимосвязи с показателями гемопоэза. Выполненная оценка показателей эритроидного ростка, позволила выявить взаимосвязь эритропоэза с уровнями NK-клеток в КМ больных РМЖ. Обращало внимание, что более высокие значения NK-клеток по обоим маркерам (CD16+ и CD56+) были отмечены в образцах со сниженным содержанием базофильных нормобластов. Аналогичное наблюдение было в отношении полихроматофильных нормобластов: при снижении уровня полихроматофильных нормобластов установлены высокие уровни популяции CD16+CD3- клеток. Это весьма интересный факт, изучение которого необходимо продолжить.

В целом изучение гемопоэза установило ряд особенностей при РМЖ. Хотелось бы отметить снижение популяций базофильных и полихроматофильных нормобластов. При этом мы наблюдали нарастание содержания оксифильных форм нормобластов. Важно то, что подобные наблюдения часто имели место в случаях вовлечения КМ в опухолевый процесс, которые зафиксированы ранее, например, при меланоме [57].

Теперь обратимся к В1-лимфоцитам, которые продуцируют значительное количество естественных антител класса М. Именно по этой причине в нашей работе мы уделили большую долю внимания минорной популяции В1-клеток, роль которой на сегодняшний день слабо изучена, и последние научные

исследования только начали приоткрывать завесу их разнообразной функциональной активности. Вырабатываемые В1-лимфоцитами естественные пентамерные IgM-антитела способны специфически связываться с опухоль-ассоциированными гликанами раковых клеток. Такое взаимодействие ведет к запуску специфического механизма, получившему название липоапоптоз, что обуславливает транспортировку липидов в клетки рака и ведет к их гибели [12].

Но не только этот аспект привлек наше внимание к популяции В1-лимфоцитов. В литературе встречаются исследования, в которых показано, что В1-лимфоциты могут влияют на иммунный ответ путем продукции цитокинов [185]. Считается, что субпопуляции В1-лимфоцитов серозных полостей конститутивно экспрессирует IL-10, что может придавать им регуляторные функции [166]. Все ли В1а-клетки могут реагировать на воспалительные сигналы с продукцией цитокинов неизвестно. В одном из экспериментов установлено, что продукция IL-10 ограничивается в основном субпопуляцией CD1d<sup>hi</sup>CD5+. Субпопуляция В1-лимфоцитов, продуцирующая IL-10, получила название В10-клетки. Сообщается, что продуцирующие IL-10 CD1d<sup>high</sup>CD5+ В лимфоциты могут способствовать опухолевому росту, подавляя фагоцитарную способность макрофагов/моноцитов как *in vivo*, так и *in vitro* [113, 145].

Изучение популяции костномозговых В1(CD5+)-лимфоцитов в нашей работе обнаружило интересные закономерности. Нами получены достоверные различия в уровнях В1- лимфоцитов при люминальном В Her2-негативном и люминальном В Her2-позитивном подтипах. Максимальное количество В1-клеток отмечены при Her2-позитивном РМЖ. Что означает данный факт? Возможно ли, что данный подтип характеризуется напряжением иммунных сил? Пока не совсем ясно. Известно, что люминальный В подтип отличается агрессивным течением, схожим с течением трижды негативного РМЖ. Люминальный В подтип РМЖ имеет высокие уровни индекса пролиферативной активности. Однако следует отметить что, несмотря на то, что количество В1-клеток при люминальном В Her2-позитивном было увеличено, взаимосвязи уровня содержания В1-лимфоцитов с индексом пролиферации опухолевых клеток, нами не установлено.

Разумеется, мы продолжим наши исследования, поскольку чрезвычайно интересным фактом может стать доказательство корреляции уровня минорной популяции В1-клеток с активностью опухолевого процесса. Особенным фактом, который заставляет продолжить научные изыскания и направить усилия в этом направлении, является упомянутое выше наблюдение о наличии выраженной пропорции НК-клеток коэкспрессирующих CD56 и CD16 у больных РМЖ с низким индексом пролиферативной активности опухолевых клеток.

На наш взгляд, еще один вариант развития событий может иметь место. Нельзя исключить, что в нашем исследовании при В люминальном Her-2 позитивном подтипе во фракции В1(CD5+)клеток присутствовала субпопуляция так называемых В10-клеток, фенотип которой, по данным научных исследований, может соответствовать CD19+CD24hiCD38hi. Этой субпопуляции приписываются регуляторные свойства и ее присутствие в опухоли коррелирует с прогрессированием рака. В таком случае высокие уровни В1-клеток при В люминальном Her-2 позитивном подтипе подтверждают агрессивность данного вида РМЖ.

Перейдем теперь к результатам изучения взаимосвязи уровней В1(CD5+)-лимфоцитов с показателями гемопоэза. И здесь нами обнаружены любопытные закономерности при РМЖ, касающиеся клеток миелоидного ряда. В целом, по обследованной группе (РМЖ и доброкачественные заболевания) наблюдалась достоверная корреляционная связь В1-клеток с эозинофильными миелоцитами, а также с плазматическими клетками. У пациенток со сниженным или нормальным содержанием сегментоядерных нейтрофилов отмечены достоверно более высокие уровни этих клеток (CD5+В1-лимфоцитов) в сравнении со случаями повышения сегментоядерных нейтрофилов. У больных РМЖ отмечены те же взаимосвязи. Указанные корреляции не наблюдались у пациенток с доброкачественными заболеваниями: единственная высоко достоверная обратная корреляционная связь популяции CD5+ В-лимфоцитов установлена с количеством моноцитов. Резюмируя полученные данные, мы бы хотели еще раз подчеркнуть важное, на наш взгляд, наблюдение. При РМЖ в сравнении с доброкачественными

заболеваниями установлена достоверная взаимосвязь CD5+V1-лимфоцитов с клетками миелоидного ряда. При нарастании пропорции последних в КМ уровни CD5+V-лимфоцитов достоверно снижаются. При РМЖ в сравнении с доброкачественными заболеваниями утрачивается высоко достоверная обратная корреляция с процентом моноцитов КМ.

Нельзя не отметить еще один любопытный факт, установленный в нашей работе. При РМЖ имеется высокая ассоциация CD5+V1-лимфоцитов с плазматическими клетками, которая при доброкачественных опухолях полностью отсутствует. Иными словами, при выраженной пропорции V1-лимфоцитов уровни плазматических клеток в КМ повышаются. Отражает ли это напряжение врожденного иммунитета? Вопрос сложный и интересный. Особый интерес это представляет вот по какой причине. В исследованиях, проведенных при РМЖ Крохиной О.В. и соавт. [11] было установлено, что к наиболее раннему проявлению присутствия опухолевых клеток в КМ можно отнести наличие скоплений плазматических клеток: у 100% больных, в пунктатах которых регистрировались скопления плазматических клеток, иммуноцитологически были определены микрометастазы в КМ [11]. В этой связи мы предполагаем, что увеличение содержания V1-лимфоцитов в КМ коррелирует с высокой вероятностью его микрометастатического поражения. И именно это предположение позволяет нам выдвинуть гипотезу, что высокие уровни V1-лимфоцитов, установленные при люминальном В Her2-позитивном РМЖ, который отличается высоким метастатическим потенциалом, обусловлены содержанием в данной фракции клеток особой субпопуляции, обладающей регуляторными свойствами. Как упоминалось выше, возможно это субпопуляция V10-клеток, фенотип которой может соответствовать CD19+CD24hiCD38hi. Разумеется, мы не ожидали обнаружить такого рода отношения. В этой связи дальнейшие исследования популяции V1(CD5+)-лимфоцитов при РМЖ могут быть не только чрезвычайно интересными, но и полезными.

Следующим, не менее интересным разделом работы была оценка корреляционных связей с остальными субпопуляциями лимфоцитов КМ, в числе

которых были TCR $\gamma\delta$ -лимфоциты. TCR $\gamma\delta$ -лимфоциты – минорная гетерогенная субпопуляция, отличающаяся высоким полиморфизмом. TCR $\gamma\delta$ -лимфоциты составляют 0,5-16% клеток CD3<sup>+</sup> в крови и лимфоидных тканях. Для данной субпопуляции характерны способность распознавать опухолевые антигены без комплекса МНС. Разнообразие антигенных рецепторов, особенности микроокружения, различные пути активации TCR- $\gamma\delta$  лимфоцитов и этапы иммунного ответа обуславливают широкий спектр функций субпопуляции TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов. Они могут влиять на рост и распространение опухоли через иммуносупрессивные эффекты. Приобретая хемокиновый и цитокиновый фенотип, активированные TCR- $\gamma\delta$  лимфоциты оказывают влияние на антителопродукцию В-клетками. Именно поэтому интересным фактом стало обнаружение достоверной связи с CD5<sup>+</sup>V1-клетками. Эти данные получены при анализе всей популяции пациентов – больных РМЖ и больных с доброкачественными заболеваниями молочной железы. Поэтому представляло интерес оценить раздельно наличие корреляций в этих 2 группах. Действительно, у больных РМЖ корреляция между CD5<sup>+</sup>V1-лимфоцитами и TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитами отсутствовала. Напротив, при доброкачественных процессах в молочной железе корреляционные связи между этими двумя субпопуляциями были очень высокими. Поэтому мы полагаем, что при РМЖ между клетками врожденного иммунитета TCR $\gamma\delta$ - и V1-лимфоцитами в КМ утрачивается указанная корреляция. Вместе с тем, важно иметь в виду, что, несмотря на высокие коэффициенты корреляции и достоверность взаимосвязи, количество больных в группе сравнения с доброкачественными процессами невелико (10 пациенток), и поэтому необходимо дальнейшее накопление материала.

Также мы хотели бы отметить, что именно для этих двух популяций (TCR $\gamma\delta$  и V1(CD5<sup>+</sup>)-лимфоциты) отмечена взаимосвязь с клиническими характеристиками РМЖ. Максимальные уровни клеток врожденного иммунитета в КМ установлены при наличии двух пораженных лимфатических узлов. При этом для V1 (CD5<sup>+</sup>)-лимфоцитов различия были особо впечатляющими. Хотя количество больных с поражением двух лимфатических узлов невелико,

совпадение данных по двум субпопуляциям клеток врожденного иммунитета и близкие к достоверным уровням значимости различий между этой группой больных и пациентками, не имеющими метастазов в лимфатических узлах, позволяет задуматься о напряжении врожденного иммунитета на этапе явного лимфогенного распространения опухоли за пределы первичного очага. Вместе с тем однозначного утверждения мы дать не можем.

Еще одним разделом работы, несомненно важным, было сопоставление показателей гемопоэза с клинико-морфологическими характеристиками РМЖ. Во-первых, следует отметить, что при характеристике гранулоцитопоза у больных РМЖ было впервые установлено, что наименее зрелые клетки гранулоцитарного ростка – промиелоциты и метамиелоциты – снижены у значительной части больных: промиелоциты – у 88,3% больных, метамиелоциты – у 32,8% больных, снижен также индекс созревания нейтрофилов у 52,5% больных. Отмечалось повышение уровня зрелых гранулоцитов у 29,5% больных, а также суммарного содержания клеток гранулоцитарного ростка у 42,6% больных.

Дальнейший углубленный анализ обнаружил определенную связь между гранулоцитопозом и стадией РМЖ. Эта взаимосвязь реализуется в основном на уровне клеток-предшественников – промиелоцитов и метамиелоцитов, содержание которых при нарастании стадии заболевания снижается. Иными словами, при нарастании стадии заболевания происходит угнетение начальных этапов гранулоцитопоза. Мы отметили, что частота снижения уровней промиелоцитов нарастала при увеличении размеров опухоли pT1-pT2-pT3. Далее, нами были изучены уровни экспрессии рецептора Her2/neu на клетках РМЖ в зависимости от содержания различных клеточных типов гранулоцитарного ростка. Полученные результаты оказались весьма интригующими: при полном отсутствии экспрессии рецептора Her2/neu на клетках РМЖ наблюдались более высокие уровни нейтрофильных миелоцитов и индекса созревания клеток гранулоцитарного ряда в сравнении со случаями РМЖ, характеризующимися позитивным Her2/neu рецептором. В контексте этих данных необходимо

подчеркнуть важную роль клеток гранулоцитарного ростка. На сегодня установлено, что нейтрофилы являются ключевыми эффекторными и регуляторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета, активно участвующими в реализации противоопухолевого ответа. Показана высокая степень пластичности и функциональная гетерогенность популяции этих клеток. Характер инфильтрации опухоли нейтрофилами и содержание этих клеток в ПК могут иметь прогностическое значение при различных типах рака. Именно поэтому данные нашего исследования представляют не только научный, но практический интерес и необходимы дальнейшие научные изыскания для установления иммунологических критериев в качестве прогностических факторов при РМЖ.

## ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ER – estrogen receptor

EUSOMA – European Society of Breast Cancer Specialists

ILC – innate lymphoid cells

MHC – major histocompatibility complex

N1- клетки – нейтрофилы N1- типа

N2- клетки – нейтрофилы N2-типа

NK – естественные киллерные клетки

RP – progesterone receptor

TCR $\gamma\delta$ -клетки – T- cell receptor

TLR – Toll-подобный рецептор

B1 лимфоциты - B1(CD5+) лимфоциты

ДК – дендритные клетки

ИЛ – интерлейкин

ИФН – интерферон

КМ – костный мозг

МДК – миелоидные дендритные клетки

МЖ – молочная железа

ОАМ – опухоль-ассоциированные макрофаги

ПДК – плазматические дендритные клетки

ПК – периферическая кровь

РМЖ – рак молочной железы

СКМП – супрессорные клетки миелоидного происхождения

T рег – регуляторные T-клетки

T х – T-хелперы

ТФР – трансформирующий фактор роста

ФНО – фактор некроза опухоли

ХТ – химиотерапия

ГКГ – главный комплекс гистосовместимости

ЦТЛ – цитотоксические T- лимфоциты

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абакушина, Е.В. Основные свойства и функции НК-клеток человека / Е.В. Абакушина, Е.Г. Кузьмина, Е.И. Коваленко // Иммунология. – 2012. – Т. 33, № 4. – С. 220-224.
2. Артамонова, Е.В. Рак молочной железы: иммунологические факторы прогноза / Е.В. Артамонова, Н.А. Огнерубов, Н.Н. Тупицын, В.П. Летягин. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2005. – 236 с.
3. Горбунова, Т.В. Сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга у детей при мелкоклеточных саркомах / Т.В. Горбунова, В.Г. Поляков, Т.В. Шведова и др. // Иммунология. – 2012. – Т. 33, № 1. – С. 37-44.
4. Горбунова, Т.В. Анализ клинически значимых субпопуляций лимфоцитов костного мозга у детей при рабдомиосаркоме и ОССЮ /Т.В.Горбунова, В.Г. Поляков, Т.В.Шведова и др. // Иммунология гемопозза. – 2013. – Т. 11, №1-2. –С.32-71.
5. 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.
6. 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.
7. Дейчман, Г.И. Влияние клеток костного мозга, селезенки и перитонеального экссудата на метастазирование опухолевых клеток в легкие у сирийских хомячков / Г.И.Дейчман, Л.М.Кашкина, Т.Е. Ключарева и др. // Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. – 1982. – Т.ХСIV, № 10. – С.102-105.
8. Кадагидзе, З.Г. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественной меланомой и раком молочной железы / З.Г. Кадагидзе,

А.И. Черткова, Т.Н. Заботина и др. // Иммунология. – 2014. – Т. 2, № 35. – С. 64-67.

9. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 г. / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петров. –М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2018.– 234 с.

10. Короткова, О.В. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных РМЖ / О.В.Короткова, Т.Н. Заботина, Л.В. Скотаренко и др. // Российский биотерапевтический журнал. –2011. – Т. 3, № 10. – С. 95-98.

11. Крохина, О.В. Иммуноцитологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг / О.В. Крохина, В.П. Летягин, Н.Н. Тупицын и др. // Иммунология гемопоеза. –2007. – Т. 4, № 2.– С. 116-131.

12. Татарский, В.В. Липоапоптоз: механизм программируемой гибели клеток при действии липидов / В.В. Татарский //Иммунология гемопоеза. –2017. – №2.–С. 33-51.

13. Тупицын, Н.Н. Снижение уровня специфических антител к углеводному антигену Лес у больных раком молочной железы / Н.Н. Тупицын, О.Е. Галанина, Н.В. Бовин и др. // Иммунология. – 2008. – Т. 29, № 2. – С. 94-97.

14. Удалова, Я.А. Дефицит специфического гуморального иммунитета и его диагностика при Лес-позитивном раке молочной железы: автореф. дис. ...канд. мед. наук: 14.01.12 / Удалова Яна Александровна; [Место защиты: РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН]. – Москва, 2010. – 28 с.

15. Чулкова, С.В. Ключевая роль популяции В-1 в иммунном ответе у больных раком желудка /С.В. Чулкова, Е.Н. Шолохова, Н.В. Грищенко и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17, № 4. – С. 64-71.

16. Adams, E.J. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition / E.J. Adams, S. Gu, A.M. Luoma// Cell Immunology. –2015. – Vol. 296, N 1. – P. 31-40. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.04.008.

17. Adams, S.Current Landscape of Immunotherapy in Breast Cancer: A Review / S. Adams, M.E.Gatti-Mays, K.Kalinsky et al. // JAMA Oncology. – 2019. – Vol. 5, N 8. – P. 1205-1214.doi: 10.1001/jamaoncol.2018.7147.

18. Aggarwal, R. Human Vgamma2Vdelta2 T cells limit breast cancer growth by modulating cell survival-, apoptosis-related molecules and microenvironment in tumors / R. Aggarwal, J. Lu, S. Kanji et al. // *International Journal of Cancer*. – 2013. – Vol. 133, N 9. – P. 2133-2144. doi:10.1002/ijc.28217.
19. Almatroodi, S.A. Blood classical monocytes phenotype is not altered in primary non-small cell lung cancer / S.A. Almatroodi, C.F. McDonald, A.L. Collins et al. // *World Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 5, N 5. – P. 1078-1087. doi: 10.5306/wjco.v5.i5.1078.
20. Annaratone, L. The Multifaceted Nature of Tumor Microenvironment in Breast Carcinomas / L. Annaratone, E. Cascardi, E. Vissio et al. // *Pathobiology*. – 2020. – Vol. 87, N 2. – P. 125-142. doi: 10.1159/000507055.
21. Artis, D. The biology of innate lymphoid cells / D. Artis, H. Spits // *Nature*. – 2015. – Vol. 517, N 7534. – P. 293-301. doi: 10.1038/nature14189.
22. Ascierto, M.L. Molecular signatures mostly associated with NK cells are predictive of relapse free survival in breast cancer patients / M.L. Ascierto, M.O. Idowu, Y. Zhao et al. // *Journal of Translational Medicine*. – 2013. – Vol. 11, N 1. – P. 145. doi: 10.1186/1479-5876-11-145.
23. Bank, I. V delta 2+ gamma delta T lymphocytes are cytotoxic to the MCF 7 breast carcinoma cell line and can be detected among the T cells that infiltrate breast tumors / I. Bank, M. Book, M. Huszar et al. // *Clinical Immunology and Immunopathology*. – 1993. – Vol. 67, N 1. – P. 17-24. doi: 10.1006/clin.1993.1040.
24. Bauernhofer, T. Preferential apoptosis of CD56dim natural killer cell subset in patients with cancer / T. Bauernhofer, I. Kuss, B. Henderson et al. // *European Journal of Immunology*. – 2003. – Vol. 33, N 1. – P. 119-124. doi: 10.1002/immu.200390014.
25. Baumgarth, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions / N. Baumgarth // *Nature Reviews Immunology*. – 2011. – Vol. 11, N 1. – P. 34-46. doi: 10.1038/nri2901.

26. Baumgarth, N. B-1 Cell Heterogeneity and the Regulation of Natural and Antigen-Induced IgM Production /N. Baumgarth// *Frontiers in Immunology*. –2016.– Vol. 7. – P. 324. doi: 10.3389/fimmu.2016.00324.
27. Baumgarth, N. Hard(y) look at B-1 cell development and function /N. Baumgarth//*Journal of Immunology*. –2017.– Vol. 199, N 10.– P. 3387-3394.doi: 10.4049/jimmunol.1700943.
28. Beano, A. Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients /A. Beano, E.Signorino, A.Evangelista et al.// *Journal of Translational Medicine*. – 2008. – Vol. 6. – P. 25.doi: 10.1186/1479-5876-6-25.
29. Beissert, S. Regulatory T cells / S. Beissert, A. Schwarz, T. Schwarz // *Journal of Investigative Dermatology*. –2006. – Vol. 126, N 1. – P. 15-24.doi: 10.1038/sj.jid.5700004.
30. Benzaid, I. High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote Vgamma9Vdelta2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo / I. Benzaid, H. Monkkonen, V. Stresing et al. // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71, N 13. – P. 4562-4572. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3862.
31. Benzaid, I. In vivo phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors trigger Vgamma9Vdelta2 T-cell antitumor cytotoxicity through ICAM-1 engagement / I. Benzaid, H. Monkkonen, E. Bonnelye et al. // *Clinical Cancer Research*– 2012. – Vol. 18, N 22. – P. 6249-6259.
32. Berland, R. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5 / R. Berland, H.H. Wortis // *Annual Review of Immunology*. – 2002. – Vol. 20. – P. 253-300. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833.
33. Béziat, V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs /V. Béziat, B. Descours, C. Parizot et al. // *PLoS ONE*. –2010. – Vol. 5, N 8. – e11966.doi: 10.1371/journal.pone.0011966.
34. Biassoni, R. The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific “activatory” or “inhibitory” natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions / R.Biassoni,

C.Cantoni, M. Falco et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 1996. – Vol. 183, N 2. – P. 645-650. doi: 10.1084/jem.183.2.645.

35. Biziota, E. Metronomic chemotherapy: A potent macerator of cancer by inducing angiogenesis suppression and antitumor immune activation / E. Biziota, L. Mavroeidis, E. Hatzimichael, P. Pappas // *Cancer Letters*. – 2017. – Vol. 400. – P. 243-251. doi: 10.1016/j.canlet.2016.12.018.

36. Björkström, N.K. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education / N.K. Björkström, P. Riese, F. Heutset et al. // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, N 19. – P. 3853-3864. doi: 10.1182/blood-2010-04-281675.

37. Björkström, N.K. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus / N.K. Björkström, T. Lindgren, M. Stoltz et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208, N 1. – P. 13-21. doi: 10.1084/jem.20100762.

38. Blair, P.A. CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients / P.A. Blair, L.Y. Noreña, F. Flores-Borja et al. // *Immunity*. – 2010. – Vol. 32, N 1. – P. 129-140. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009.

39. Boero, S. Analysis of in vitro ADCC and clinical response to trastuzumab: Possible relevance of FcRIIIA/FcRIIA gene polymorphisms and HER-2 expression levels on breast cancer cell lines / S. Boero, A. Morabito, B. Banelli et al. // *Journal of Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 13. – P. 1-14. doi: 10.1186/s12967-015-0680-0.

40. Boismenu, R. Intraepithelial  $\gamma\delta$ T cells exposed by functional genomics / R. Boismenu, W. Havran // *Genome Biology*. – 2001. – Vol. 2, N 11. – P. 1031-1035. doi: 10.1186/gb-2001-2-11-reviews1031.

41. Bondada, S. Role of CD5 in growth regulation of B-1 cells / S. Bondada, G. Bikah, D.A. Robertson, G. Sen // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2000. – Vol. 252. – P. 141-149. doi: 10.1007/978-3-642-57284-5\_15.

42. Bonneville, M. Selection of intraepithelial  $\gamma\delta$ T cells: the holy GrIEL at last? / M. Bonneville // *Nature Immunology*. – 2006. – Vol. 7, N 8. – P. 791-792. doi: 10.1038/ni0806-791.
43. Bonneville, M. Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors / M. Bonneville, E. Scotet // *Current Opinion in Immunology*. – 2006. – Vol. 18, N 5. – P. 539-546. doi: 10.1016/j.coi.2006.07.002.
44. Born, W.K. The function of gammadelta T cells in innate immunity / W.K. Born, C.L. Reardon, R.L. O'Brien // *Current Opinion in Immunology*. – 2006. – Vol. 18, N 1. – P. 31-38. doi: 10.1016/j.coi.2005.11.007.
45. Born, W. gammadeltaT lymphocytes – selectable cells within the innate system? / W. Born, N. Jin, K. Aydintung et al. // *Journal of Clinical Immunology*. – 2007. – Vol. 27, N 2. – P. 133-144. doi: 10.1007/s10875-007-9077-z.
46. Bose, A. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients / A. Bose, T. Chakraborty, K. Chakraborty et al. // *Cancer Immunology*. – 2008. – Vol. 8, N 1. – P. 10.
47. Brandes, M. Professional antigen-presentation function by human  $\gamma\delta$ T cells / M. Brandes, K. Willmann, B. Moser // *Science*. – 2005. – Vol. 309, N 5732. – P. 264-268. doi: 10.1126/science.1110267.
48. Brandlein, S. Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients / S. Brandlein, J. Lorenz, N. Ruoff et al. // *Human Antibodies*. – 2002. – Vol. 11, N 4. – P. 107-119. doi: 10.3233/HAB-2002-11401.
49. Burmester, G.-R. *Visual immunology* / G.-R. Burmester, A. Pecutto. – M.: Binom. 3-rd ed., 2014. – 320p.
50. Cantoni, C. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily / C. Cantoni, C. Bottino, M. Vitale et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 1999. – Vol. 189, N 5. – P. 787-796. doi: 10.1084/jem.189.5.787.
51. Capietto, A.H. Stimulated gammadelta T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer / A.H. Capietto, L. Martinet, J.J. Fournie //

Journal of Immunology. - 2011. - Vol. 187, N 2. - P. 1031-1038.doi: 10.4049/jimmunol.1100681.

52. Caras, I. Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients / I. Caras, A. Grigorescu, C. Stavaru et al. // Cancer Immunology, Immunotherapy. – 2004. – Vol. 53, N 12. – P. 1146-1152.doi: 10.1007/s00262-004-0556-2.

53. Cardoso, F. Global analysis of advanced/metastatic breast cancer: Decade report (2005–2015) / F. Cardoso, D. Spence, S. Mertz et al. // Breast. –2018. – Vol. 39. – P. 131-138.doi: 10.1016/j.breast.2018.03.002.

54. Cardoso, F. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5) / F. Cardoso, S. Paluch-Shimon, E. Senkus et al. // Annals of Oncology. – 2020. – Vol. 31, N 12. – P. 1623-1649.doi: 10.1016/j.annonc.2020.09.010.

55. Carson, W.E. Cellular Immunity in Breast Cancer Patients Completing Taxane Treatment / W.E. Carson, C.L. Shapiro, T.R. Crespin et al. // Clinical Cancer Research– 2004. – Vol. 10, N 10. – P. 3401-3409.doi: 10.1158/1078-0432.CCR-1016-03.

56. Cheang, M.C. Defining Breast Cancer Intrinsic Subtypes by Quantitative Receptor Expression / M.C. Cheang, M. Martin, T.O. Nielsen et al. // Oncologist. – 2015. – Vol. 20, N 5. – P. 474-482.doi: 10.1634/theoncologist.2014-0372.

57. 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, N 6. – P. 627. doi: 10.3390/cells8060627.

58. Choi, Y.S. B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM / Y.S. Choi, J.A. Dieter, K. Rothausler et al. // European Journal of Immunology. – 2012. – Vol. 42, N 1. – P. 120-129. doi: 10.1002/eji.201141890.

59. Colonna, M. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells / M. Colonna, J. Samaridis // Science. – 1995. – Vol. 268, N 5209. – P. 405-408.doi: 10.1126/science.7716543.

60. Cooper, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets / M.A. Cooper, T.A. Fehniger, M.A. Caligiuri // *Trends in Immunology*. – 2001. – Vol. 22, N 11. – P. 633-640. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02060-9.

61. Cortez, V.S. Innate lymphoid cells: new insights into function and development / V.S. Cortez, M.L. Robinette, M. Colonna // *Current Opinion in Immunology*. – 2015. – Vol. 32. – P. 71-77. doi: 10.1016/j.coi.2015.01.004.

62. Das, H. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function / H. Das, V. Groh, C. Kuijl et al. // *Immunity*. – 2001. – Vol. 15, N 1. – P. 83-93. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00168-6.

63. Davey, M.S. Clonal selection in the human Vdelta1 T cell repertoire indicates gammadelta TCR-dependent adaptive immune surveillance / M.S. Davey, C.R. Willcox, S.P. Joyce et al. // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 14760. doi: 10.1038/ncomms14760.

64. Davey, M.S. The human Vdelta2(+) T-cell compartment comprises distinct innate-like Vgamma9(+) and adaptive Vgamma9(-) subsets / M.S. Davey, C.R. Willcox, S. Hunter et al. // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 1760. doi: 10.1038/s41467-018-04076-0.

65. Dedeoglu, F. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NF-kappaB / F. Dedeoglu, B. Horwitz, J. Chaudhuri et al. // *International Immunology*. – 2004. – Vol. 16, N 3. – P. 395-404. doi: 10.1093/intimm/dxh042.

66. DeGiorgi, U. Association between circulating tumor cells and peripheral blood monocytes in metastatic breast cancer / U. DeGiorgi, M. Mego, E. Scarpia et al. // *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. – 2019. – Vol. 11. – P. 175883591986606. doi: 10.1177/1758835919866065.

67. Della Chiesa, M. Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? / M. Della Chiesa, M. Falco, M. Podesta et al. // *Blood*. – 2012. – Vol. 119, N 2. – P. 399-410. doi: 10.1182/blood-2011-08-372003.

68. De Maria, A. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD161 NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation / A. De Maria, F.Bozzano, C.Cantoni, L. Moretta// Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2011. – Vol. 108, N 2. – P. 728-732.doi: 10.1073/pnas.1012356108.
69. Dhar, S. Lysis of aminobisphosphonate-sensitized MCF-7 breast tumor cells byV $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells / S. Dhar, S.V. Chiplunkar // Cancer Immunology. – 2010. – Vol. 10. – P. 10.
70. Dieci, M.V. The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a deadend? / M.V. Dieci, G. Griguolo, F. Miglietta, V. Guarneri // Cancer Treatment Reviews. – 2016. –Vol. 46. – P. 9-19.doi: 10.1016/j.ctrv.2016.03.011.
71. Donskov, F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinicaltrials / F. Donskov // Seminars in Cancer Biology. – 2013. – Vol. 23, N 3. – P. 200-207. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.02.001.
72. Dorshkind, K. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential / K. Dorshkind, E. Montecino-Rodriguez // Nature Reviews Immunology. – 2007. – Vol. 7, N 3. – P. 213-219. doi: 10.1038/nri2019.
73. Doubrovina, E.S. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma /E.S.Doubrovina, M.M.Doubrovin, E.Videret al. // Journal of Immunology. – 2003. – Vol. 171, N 12. – P. 6891-6899. doi: 10.4049/jimmunol.171.12.6891.
74. Dutta, I. Apoptosis induced via gamma delta T cell antigen receptor "blocking" antibodies: a cautionary tale / I. Dutta, L.M. Postovit, G.M. Siegers // Frontiers in Immunology. – 2017. – Vol. 8. – P. 776. doi:10.3389/fimmu.2017.00776.
75. Elboim, M. HSV-2 specifically downregulates HLA-C expression to render HSV-2-infected DCs susceptible to NK cell killing / M. Elboim, I. Grodzovski, E. Djianet al. //PLoS Pathology. – 2013. – Vol. 9, N 3. – e1003226. doi: 10.1371/journal.ppat.1003226.
76. Elliott, J.M.MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment / J.M. Elliott, J.A.

Wahle, W.M. Yokoyama. // *Journal of Experimental Medicine*. –2010. – Vol. 207, N 10. – P. 2073-2079.doi: 10.1084/jem.20100986.

77. Emens, L.A. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes / L.A. Emens// *Clinical Cancer Research*. – 2018. –Vol. 24, N 3. – P. 511-520.doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3001.

78. Ethier, J.L. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer: a systematic review and meta-analysis / J.L. Ethier, D. Desautels, A. Templeton et al. // *Breast Cancer Research*. – 2017. – Vol. 19, N 1. – P. 2. doi: 10.1186/s13058-016-0794-1.

79. Farag, S.S. Human natural killer cell development and biology / S.S.Farag, M.A. Caligiuri // *Blood Reviews*. – 2006. – Vol. 20, N 3. – P. 123-137.doi: 10.1016/j.blre.2005.10.001.

80. Fauriat, C. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition / C. Fauriat, E.O. Long, H.G.Ljunggren, Y.T. Bryceson// *Blood*. – 2010. – Vol. 115, N 11. – P. 2167-2176.doi: 10.1182/blood-2009-08-238469.

81. Feeney, A.J. Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences / A.J. Feeney // *Journal of Experimental Medicine*. – 1990. – Vol. 172, N 5. – P. 1377-1390. doi: 10.1084/jem.172.5.1377.

82. Feng, A.L.CD16+ monocytes in breast cancer patients:expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis /A.L.Feng,J.K. Zhu, J.T.Sun et al. // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2011. – Vol. 164, N 1. – P. 57- 65.doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04321.x.

83. Ferlay, J. Cancer statistics for the year 2020: An overview / J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataramet al. // *International Journal of Cancer*. –2021. doi: 10.1002/ijc.33588.

84. Ferlazzo, G. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells / G.Ferlazzo, M.L. Tsang, L. Morettaet al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2002. – Vol. 195, N 3. – P. 343-351.doi: 10.1084/jem.20011149.

85. Ferlazzo, G. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic / G. Ferlazzo, D. Thomas, S.L. Lin et al. // *Journal of Immunology*. –2004. – Vol. 172, N3. – P. 1455-1462.doi: 10.4049/jimmunol.172.3.1455.

86. Ferlay, J. Cancer statistics for the year 2020: An overview / J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram et al. // *International Journal of Cancer*. – 2021.doi: 10.1002/ijc.33588.

87. Fernandez, S.V. Immune phenotype of patients with stageIV metastatic inflammatory breast cancer /S.V.Fernandez, A.W.MacFarlane, M. Jillab et al.// *Breast Cancer Research*. – 2020. – Vol. 22, N 1. – P. 134. doi: 10.1186/s13058-020-01371-x.

88. Feuerer, M. Enrichment of memory T-cells and the profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients / M. Feuerer, M. Rocha, L. Bai et al. // *International Journal of Cancer*. – 2001. – Vol. 92, N 1. – P. 96-103.

89. Foulds, G.A. Immune-Phenotyping and Transcriptomic Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Breast Cancer: Identification of a 3 Gene Signature Which Predicts Relapse of Triple Negative Breast Cancer / G.A. Foulds, J.Vadakekolathu, T.M.A.Abdel-Fatah et al. // *Frontiers in Immunology*. –2018. – Vol. 9.– P. 2028. doi: 10.3389/fimmu.2018.02028.

90. Frazao, A.CD16<sup>+</sup> NKG2A<sup>high</sup> Natural Killer Cells Infiltrate Breast Cancer-Draining Lymph Nodes / A. Frazao, M. Messaoudene, N. Nunez et al. // *Cancer Immunology Research*. – 2019. Vol. 7, N 2. – P. 208-218. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0085.

91. Freud, A.G. Human natural killer cell development / A.G.Freud, M.A. Caligiuri // *Immunology Reviews*.– 2006. – Vol. 214. – P. 56-72.doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x.

92. Freud, A.G. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo / A.G. Freud, A.Yokohama, B. Becknell et al. // *Journal of Experimental Medicine*. –2006. – Vol. 203, N 4. – P. 1033–1043.doi: 10.1084/jem.20052507.

93. Freud, A.G. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity / A.G. Freud, B.L. Mundy-Bosse, J. Yu, M.A. Caligiuri // *Immunity*. – 2017. – Vol. 47, N 5. – P. 820-833. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.008.
94. Gaafar, A. Defective gammadelta T-cell function and granzyme B gene polymorphism in a cohort of newly diagnosed breast cancer patients / A. Gaafar, M.D. Aljurf, A. Al-Sulaiman et al. // *Experimental Hematology*. - 2009. - Vol. 37, N 7. - P. 838-848. doi: 10.1016/j.exphem.2009.04.003.
95. Garcia-Chagollan, M. Expression of NK cell surface receptors in breast cancer tissue as predictors of resistance to antineoplastic treatment / M. Garcia-Chagollan, I.E. Carranza-Torres, P. Carranza-Rosales et al. // *Technology in Cancer Research & Treatment*. – 2018. – Vol. 17: 1533033818764499. doi: 10.1177/1533033818764499.
96. Golden-Mason, L. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure / L. Golden-Mason, L. Madrigal-Estebas, E. McGrath et al. // *Gut*. – 2008. – Vol. 57, N 8. – P. 1121-1128. doi: 10.1136/gut.2007.130963.
97. Guo, B.L. Innate anti-breast cancer immunity of apoptosis resistant human gammadelta-T cells / B.L. Guo, Z. Liu, W.A. Aldrich, R.D. Lopez // *Breast cancer research and treatment*. – 2005. – Vol. 93, N 2. – P. 169-175. doi: 10.1007/s10549-005-4792-8.
98. Hardy, R.R. B cell development pathways / R.R. Hardy, K. Hayakawa // *Annual Review of Immunology*. – 2001. – Vol. 19. – P. 595-621. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.595.
99. Harly, C. Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells / C. Harly, C.M. Peigné, E. Scotet // *Frontiers in Immunology*. – 2015. – Vol. 5. – P. 657. doi: 10.3389/fimmu.2014.00657.
100. Hatjiharissi, E. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc $\gamma$ RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism / E. Hatjiharissi, L. Xu, D.D. Santos et al. // *Blood*. – 2007. – Vol. 110, N 7. – P. 2561-2564. doi: 10.1182/blood-2007-01-070656.

101. Hayakawa, K. The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice / K. Hayakawa, R.R. Hardy, D.R. Parks, L.A. Herzenberg // *Journal of Experimental Medicine*. – 1983. – Vol. 157, N 1. – P. 202-218. doi: 10.1084/jem.157.1.202.

102. Hayday, A.  $\gamma\delta$  cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection / A. Hayday // *Annual Review of Immunology*. – 2000. – Vol. 18. – P. 975-1026. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.975.

103. He, J. Pretreatment lymphocyte to monocyte ratio as a predictor of prognosis in patients with early-stage triple-negative breast cancer / J. He, P. Lv, X. Yang et al. // *Tumor Biology* – 2016. – Vol. 37, N 7. – P. 9037-9043. doi: 10.1007/s13277-016-4793-8.

104. Hensel, F. Ten-year follow up of a prospective trial for the targeted therapy of gastric cancer with the human monoclonal antibody PAT-SC1 / F. Hensel, W. Timmerman, B.H. von Rahden et al. // *Oncology Reports*. – 2014. – Vol. 31, N 3. – P. 1059-1066. doi: 10.3892/or.2014.2987.

105. Hernández, C.M. Usefulness of lymphocyte-to-monocyte, neutrophil-to-monocyte and neutrophil-to-lymphocyte ratios as prognostic markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy / C.M. Hernández, A.P. Madrona, P.J. Gil Vázquez et al. // *Clinical and Translational Oncology*. – 2017. – Vol. 20, N 4. – P. 476-483. doi: 10.1007/s12094-017-1732-0.

106. Herzenberg, L.A. B-1 cells: the lineage question revisited / L.A. Herzenberg // *Immunological Reviews*. – 2000. – Vol. 175. – P. 9-22.

107. Hidalgo, J.V. Histological Analysis of  $\gamma\delta$  T Lymphocytes Infiltrating Human Triple-Negative Breast Carcinomas / J.V. Hidalgo, P. Bronsert, M. Orłowska-Volk et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 632. doi: 10.3389/fimmu.2014.00632.

108. Hippen, K.L. CD5 maintains tolerance in anergic B cells / K.L. Hippen, L.E. Tze, T.W. Behrens // *Journal of Experimental Medicine*. – 2000. – Vol. 191, N 5. – P. 883-890. doi: 10.1084/jem.191.5.883.

109. Holodick, N.E. Immunoglobulin secretion by B1 cells: differential intensity and IRF4-dependence of spontaneous IgM secretion by peritoneal and splenic B1 cells/ N.E. Holodick, J.R. Tumang, T.L. Rothstein // *European Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 40.– P. 3007-3016. doi: 10.1002/eji.201040545.

110. Holodick, N.E. Splenic B-1a cells expressing CD138 spontaneously secrete large amounts of immunoglobulin in naive mice / N.E. Holodick, T. Vizconde, T.L. Rothstein // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 129. doi: 10.3389/fimmu.2014.00129.

111. Holodick, N.E. Age-Related Decline in Natural IgM Function: Diversification and Selection of the B-1a Cell Pool with Age / N.E. Holodick, T. Vizconde, T.J. Hopkins et al. // *Journal of Immunology*. – 2016. – Vol. 196, N 10. – P. 4348-4357. doi: 10.4049/jimmunol.1600073.

112. Honkanen, T.J. Prognostic and predictive role of spatially positioned tumour infiltrating lymphocytes in metastatic HER2 positive breast cancer treated with trastuzumab / T.J. Honkanen, T. Moilanen, P. Karihtala et al.// *Scientific Reports* – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 18027. doi: 10.1038/s41598-017-18266-1.

113. Horikawa, M. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice / M. Horikawa, V. Minard-Colin, T. Matsushita, T.F. Tedder // *Journal of Clinical Investigation*. –2011.– Vol. 121, N 11.– P. 4268-4280.doi: 10.1172/JCI59266.

114. Horlock, C. The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer / C. Horlock, B. Stott, P.J. Dyson et al. // *British Journal of Cancer*. –2009. – Vol. 100, N 7. – P. 1061-1067.doi: 10.1038/sj.bjc.6604963.

115. Hunter, S. Human liver infiltrating gammadelta T cells are composed of clonally expanded circulating and tissue-resident populations / S. Hunter, C.R. Willcox, M.S. Davey et al. // *Journal of Hepatology*. – 2018. – Vol. 69, N 3. – P. 654-665. doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.007.

116. Iwata, Y. Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells / Y. Iwata, T. Matsushita, M.

Horikawa et al. // *Blood*. – 2011. – Vol. 117, N 2. – P. 530-541. doi: 10.1182/blood-2010-07-294249.

117. Jin, J. CD11b/CD27 NK cells are associated with the progression of lung carcinoma / J. Jin, B. Fu, X. Mei et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, N 4.– P. 1024. doi: 10.1371/journal.pone.0061024.

118. Joncker, N.T. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment / N.T. Joncker, N. Shifrin, F. Delebecque, D.H. Raulet. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2010. – Vol. 207, N 10. – P. 2065-2072. doi: 10.1084/jem.20100570.

119. Jonsson, A.H. Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms / A.H. Jonsson, W.M. Yokoyama. // *Advances in Immunology*. – 2009. – Vol. 101. – P. 27-79. doi: 10.1016/S0065-2776(08)01002-X.

120. Kabelitz, D. Editorial: "Recent Advances in Gamma/Delta T Cell Biology: New Ligands, New Functions, and New Translational Perspectives" / D. Kabelitz, J. Dechanet-Merville // *Frontiers in Immunology*. – 2015. – Vol. 6.– P. 371. doi: 10.3389/fimmu.2015.00371.

121. Konjevic, G. Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies / G. Konjevic, V. Jurisic, V. Jovic et al. // *Immunology Research*. – 2012. – Vol. 52, N 1-2. – P. 139-156. doi: 10.1007/s12026-012-8285-7.

122. Kresovich, J.K. Prediagnostic Immune Cell Profiles and Breast Cancer / J.K. Kresovich, K.M. O'Brien, Z. Xu et al. // *JAMA Network Open*. – 2020. – Vol. 3, N 1. – e1919536. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.19536.

123. Lafont, V. Plasticity of gammadelta T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response / V. Lafont, F. Sanchez, E. Laprevotte et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 622. doi: 10.3389/fimmu.2014.00622.

124. Lafrenie, R.M. Frequency of Immune Cell Subtypes in Peripheral Blood Correlates With Outcome for Patients With Metastatic Breast Cancer Treated With High-Dose Chemotherapy / R.M. Lafrenie, L. Speigl, C.A. Buckner et al. // *Clinical Breast Cancer*. – 2019. – Vol. 19, N 6. – P. 433-442. doi: 10.1016/j.clbc.2019.05.002.

125. Lanier, L.L. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56) / L.L. Lanier, C. Chang, M. Azuma et al. // *Journal of Immunology*. – 1991. – Vol. 146, N 12. – P. 4421-4426.

126. Lee, S. Increased proportion of the CD56bright NK cell subset in patients chronically infected with hepatitis C virus (HCV) receiving interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy / S.Lee, M.W. Watson, J.P. Flexman et al. // *Journal of Medical Virology*. – 2010. – Vol. 82, N 4. – P. 568-574.doi: 10.1002/jmv.21742.

127. Le Garff-Tavernier, M.Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span / M. Le Garff-Tavernier, V. Béziat, J. Decocq, et al.// *Aging Cell*. –2010. – Vol. 9, N 4. – P. 527-535.doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00584.x.

128. Lester, S.C. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast / S.C. Lester, S. Bose, Y.Y. Chen et al. // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2009. – Vol. 133, N 1. – P. 15-25. doi: 10.1043/1543-2165-133.1.15.

129. Linares-Galiana, I. Changes in peripheral immune cells afterintraoperative radiation therapy in low-riskbreast cancer / I. Linares-Galiana, M.A. Berenguer-Frances, R. Canas-Cortes // *Journal of Radiation Research*. – 2021. –Vol. 62, N 1. – P. 110-118. doi: 10.1093/jrr/rraa083.

130. Liu, J. RETRACTED: Aberrant frequency of IL-10-producing B cells and its association with Treg and MDSC cells in Non-Small Cell Lung Carcinoma patients / J. Liu, H. Wang, Q. Yu et al. // *Human Immunology*. – 2016. – Vol. 77, N 1. – P. 84-89. doi: 10.1016/j.humimm.2015.10.015.

131. Ljunggren, H.G. In search of the ‘missingself’: MHC molecules and NK cell recognition / H.G.Ljunggren, K. Karre // *Immunology Today*. – 1990. – Vol. 11, N 7. – P. 237-244.

132. Long, E.O.Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm / E.O. Long// *Immunological Reviews*. – 2008. – Vol. 224. – P. 70-84.doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00660.x.

133. Lopez-Botet, M. Dual role of natural killer cells on graft rejection and control of cytomegalovirus infection in renal transplantation / M. Lopez-Botet, C. Vilches, D. Redondo-Pachon et al. // *Frontiers in Immunology*. □2017.□ Vol. 8.□P. 166.doi: 10.3389/fimmu.2017.00166.

134. Losada, B.Pretreatment neutrophil/lymphocyte, platelet/lymphocyte, lymphocyte/monocyte, and neutrophil/monocyte ratios and outcome in elderly breast cancer patients / B. Losada, J.A.Guerra, D.Malón et al. // *Clinical and Translational Oncology*. – 2019. – Vol. 21, N 7. – P. 855-863.doi: 10.1007/s12094-018-1999-9.

135. Lu, J.Breast Cancer Chemo-immunotherapy through Liposomal Delivery of an Immunogenic Cell Death Stimulus Plus Interference in the IDO-1 Pathway / J. Lu, X.Liu, Y.-P. Liao et al. // *ACS Nano*. – 2018. – Vol. 12, N 11. – P. 11041-11061.doi: 10.1021/acsnano.8b05189.

136. Ma, C. Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer / C. Ma, Q. Zhang, J. Ye et al. // *Journal of Immunology*. - 2012. - Vol. 189, N 10. - P. 5029-5036.doi: 10.4049/jimmunol.1201892.

137. Mamessier, E. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity /E.Mamessier,A. Sylvain,M.-L.Thibult et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – Vol. 121, N 9. – P. 3609-3622.doi: 10.1172/JCI45816.

138. Mamessier, E. Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition / E. Mamessier, A. Sylvain, F. Bertucciet al. // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71, N 21. – P. 6621-6632.doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0792.

139. Mamessier, E.Peripheral Blood NK Cells from Breast Cancer Patients Are Tumor-Induced Composite Subsets /E.Mamessier,L.C. Pradel, M-L. Thibult et al. // *Journal of Immunology*. –2013. – Vol. 190, N 5. – P. 2424-2436.doi: 10.4049/jimmunol.1200140.

140. Mangan, B.A. Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vdelta3 T cells / B.A. Mangan, M.R. Dunne, V.P. O'Reilly et al. //

Journal of Immunology. – 2013. – Vol. 191, N 1. – P. 30-34. doi: 10.4049/jimmunol.1300121.

141. Marcenaro, E. Uptake of CCR7 and acquisition of migratory properties by human KIR<sup>+</sup> NK cells interacting with monocyte derived DC or EBV cell lines: regulation by KIR/HLA-class I interaction / E. Marcenaro, S. Cantoni, S. Pesce et al. // Blood. – 2009. – Vol. 114, N 19. – P. 4108-4116. doi: 10.1182/blood-2009-05-222265.

142. Marcenaro, E. KIR2DS1-dependent acquisition of CCR7 and migratory properties by human NK cells interacting with allogeneic HLA-C2<sup>+</sup> DCs or T-cell blasts / E. Marcenaro, S. Pesce, S. Sivoiriet et al. // Blood. – 2013. – Vol. 121, N 17. – P. 3396-3401. doi: 10.1182/blood-2012-09-458752.

143. Mavilio, D. Characterization of CD56<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals / D. Mavilio, G. Lombardo, J. Benjamin et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102, N 8. – P. 2886-2891. doi: 10.1073/pnas.0409872102.

144. Melsen, J.E. Human Bone Marrow-Resident Natural Killer Cells Have a Unique Transcriptional Profile and Resemble Resident Memory CD8<sup>+</sup> T Cells / J.E. Melsen, G. Lugthart, C. Vervat et al. // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – P. 1829. doi: 10.3389/fimmu.2018.01829.

145. Minard-Colin, V. Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV / V. Minard-Colin, Y. Xiu, J.C. Poe et al. // Blood. – 2008. – Vol. 112, N 4. – P. 1205-1213. doi: 10.1182/blood-2008-01-135160.

146. Mizoguchi, A. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation / A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, H. Takedatsu et al. // Immunity. – 2002. – Vol. 16, N 2. – P. 219-230. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00274-1.

147. Mohammed, Z.M. The relationship between lymphocyte subsets and clinico-pathological determinants of survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer / Z.M. Mohammed, J.J. Going, D.C. McMillan et al. // British Journal of Cancer. – 2013. – Vol. 109, N 6. – P. 1676-1684. doi: 10.1038/bjc.2013.493.

148. Montaldo, E. Humaninnatelymphoid cells / E. Montaldo, P. Vacca, C. Vitale et al.// Immunology Letters. – 2016. – Vol. 179. – P. 2-8.doi: 10.1016/j.imlet.2016.01.007.
149. Montecino-Rodriguez, E. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor / E. Montecino-Rodriguez, H. Leathers, K. Dorshkind // Nature Immunology. – 2006. – Vol. 7, N 3. – P. 293-301. doi:10.1038/ni1301.
150. Moretta, A. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function / A.Moretta, G.Tambussi, C.Bottinoet al. // Journal of Experimental Medicine. – 1990. – Vol. 171, N 3. – P. 695-714.doi: 10.1084/jem.171.3.695.
151. Moretta, A. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities / A.Moretta, M. Vitale, C.Bottinoet al. // Journal of Experimental Medicine. – 1993. – Vol. 178, N 2. – P. 597-604.
152. Moretta, A. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity /A.Moretta, C.Bottino, M. Vitale et al. // Annual Review of Immunology. – 2001. – Vol. 19. – P. 197-223.doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.197.
153. Moretta, A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues / A. Moretta// Nature Reviews Immunology. – 2002. – Vol. 2, N 12. – P. 957-964.doi: 10.1038/nri956.
154. Moretta, A. What is a natural killer cell? / A. Moretta, C. Bottino, M. C. Mingari et al. // Nature Immunology. – 2002. – Vol. 3, N 1. – P. 6-8.doi: 10.1038/ni0102-6.
155. Moretta, L. Human natural killer cells: their origin, receptors and function / L.Moretta, C. Bottino, D. Pende et al. // European Journal of Immunology. – 2002. – Vol. 32, N 5. – P. 1205-1211.doi: 10.1002/1521-4141(200205)32:5<1205::AID-IMMU1205>3.0.CO;2-Y.

156. Moretta, L. Different checkpoints in human NK-cell activation / L. Moretta, C. Bottino, D. Pende et al. // *Trends in Immunology*. – 2004. – Vol. 25, N 12. – P. 670-676. doi: 10.1016/j.it.2004.09.008.

157. Morita, C. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens / C. Morita, C. Jin, G. Sarikonda, H. Wang // *Immunology Reviews*. – 2007. – Vol. 215. – P. 59-76. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00479.x.

158. Muccio, L. Analysis of memorylike natural killer cells in human cytomegalovirus-infected children undergoing alpha $\beta$ T and B cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies / L. Muccio, A. Bertaina, M. Falco et al. // *Haematologica*. – 2016. – Vol. 101, N 3. – P. 371-381. doi: 10.3324/haematol.2015.134155.

159. Muntasell, A. NK cell infiltrates and HLA class I expression in primary HER2(+) breast cancer predict and uncouple pathological response and disease-free survival / A. Muntasell, F. Rojo, S. Servitja et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol. 25, N 5. – P. 1535-1545. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2365.

160. Muraro, E. A different immunologic profile characterizes patients with HER-2-overexpressing and HER-2-negative locally advanced breast cancer: implications for immune-based therapies / E. Muraro, D. Martorelli, E. Turchet et al. // *Breast Cancer Research*. – 2011. – Vol. 13, N 6. – P. 117. doi: 10.1186/bcr3060.

161. Muraro, E. Improved natural killer cell activity and retained anti-tumor CD8<sup>+</sup> T cell responses contribute to the induction of a pathological complete response in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy / E. Muraro, E. Comaro, R. Talamini et al. // *Journal of Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 13, N 1. – P. 204. doi: 10.1186/s12967-015-0567-0.

162. Nersesian, S. NK cell infiltration is associated with improved overall survival in solid cancers: A systematic review and meta-analysis / S. Nersesian, S. L. Schwartz, S. R. Grantham et al. // *Translational Oncology*. – 2021. – Vol. 14, N 1. – P. 100930. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100930.

163. Newman, A.M. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles / A.M. Newman, C.L. Liu, M.R. Green // *Nature Methods*. – 2015. – Vol. 12, N 5. – P. 453-457. doi: 10.1038/nmeth.3337.

164. Ni, X.-J. An Elevated Peripheral Blood Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Predicts Favorable Response and Prognosis in Locally Advanced Breast Cancer following Neoadjuvant Chemotherapy / X.-J. Ni, X.-L. Zhang, Q.-W. Ou-Yang et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, N 11. – e111886. doi: 10.1371/journal.pone.0111886.

165. Nieto-Velázquez, N.G. Altered expression of natural cytotoxicity receptors and NKG2D on peripheral blood NK cell subsets in breast cancer patients / N.G. Nieto-Velázquez, Y.D. Torres-Ramos, J.L. Muñoz-Sánchez et al. // *Translational Oncology*. – 2016. – Vol. 9, N 5. – P. 384-391. doi: 10.1016/j.tranon.2016.07.003.

166. O'Garra, A. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10 / A. O'Garra, R. Chang, N. Go et al. // *European Journal of Immunology*. – 1992. – Vol. 22, N 3. – P. 711-717. doi: 10.1002/eji.1830220314.

167. Pardoll, D. Immunology. Stress, NK Receptors, and Immune Surveillance / D. Pardoll // *Science*. – 2001. – Vol. 294, N 5542. – P. 534-538. doi: 10.1126/science.1066284.

168. Park, M.H. High expression of CX3CL1 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells, natural killer cells, and dendritic cells in breast carcinoma / M.H. Park, J.S. Lee, J.H. Yoon // *Journal of Surgical Oncology*. – 2012. – Vol. 106, N 4. – P. 386-392. doi: 10.1002/jso.23095.

169. Parker, M.E. Regulation of  $\gamma\delta$  T-Cell Effector Diversification in the Thymus / M.E. Parker, M. Ciofani // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 42. doi: 10.3389/fimmu.2020.00042.

170. Pende, D. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells / D. Pende, S. Parolini, A. Pessino et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 1999. – Vol. 190, N 10. – P. 1505-1516. doi: 10.1084/jem.190.10.1505.

171. Pende, D. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation / D. Pende, M.

Falco, M. Vitale et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1179. doi: 10.3389/fimmu.2019.01179.

172. Peng, G. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway / G. Peng, H.Y. Wang, W. Peng et al. // *Immunity*. – 2007. – Vol. 27, N 2. – P. 334-348. doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.020.

173. Pietra, G. Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity / G. Pietra, C. Manzini, S. Rivara et al. // *Cancer Research*. – 2012. – Vol. 72, N 6. – P. 1407-1415. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2544.

174. Poli, A. CD56<sup>bright</sup> natural killer (NK) cells: an important NK cell subset / A. Poli, T. Michel, M. Thérésine // *Immunology*. – 2009. – Vol. 126, N 4. – P. 458-465. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x.

175. Puztai, L. AACR Virtual Meeting, 27 April 2020, Abstr. CTO11.

176. Pylaeva, E. The essential role of type I interferons in differentiation and activation of tumor-associated neutrophils / E. Pylaeva, S. Lang, J. Jablonska // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 629. doi: 10.3389/fimmu.2016.00629.

177. Rampoldi, F. Revisiting the Interaction of  $\gamma\delta$  T-Cells and B-Cells / F. Rampoldi, L. Ullrich, I. Prinz // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, N 3. – P. 743. doi: 10.3390/cells9030743.

178. Rathore, A.S. Is the tumor infiltrating natural killer cell (NK-TILs) count in infiltrating ductal carcinoma of breast prognostically significant? / A.S. Rathore, M.M. Goel, A. Makker et al. // *The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2014. – Vol. 15, N 8. – P. 3757-3761. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.8.3757.

179. Roberti, M.P. Biological role of NK cells and immunotherapeutic approaches in breast cancer / M.P. Roberti, J. Mordoh, E.M. Levy // *Frontiers in Immunology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 375. doi: 10.3389/fimmu.2012.00375.

180. Rosental, B. Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44 / B. Rosental, M. Brusilovsky, U. Hadad et

al.// Journal of Immunology. –2011. – Vol. 187, N 11. – P. 5693-5702.doi: 10.4049/jimmunol.1102267.

181. Sarvaria, A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity /A. Sarvaria, J.A. Madrigal, A. Saudemont // Cellular & Molecular Immunology. – 2017. – Vol. 14, N 8. – P. 662-674. doi: 10.1038/cmi.2017.35.

182. Savage, H.P. Characteristics of natural antibody-secreting cells / H.P. Savage, N. Baumgarth // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2015. – Vol. 1362, N 1. – P. 132-142. doi: 10.1111/nyas.12799.

183. Schmid, P. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer / P. Schmid, S. Adams, H.S.Rugo et al. // The New England Journal of Medicine. – 2018. – Vol. 379.– P. 2108-2121.doi: 10.1093/jnci/djab004.

184. Schmidt, M. A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin kappa C as a compatible prognostic marker in human solid tumors / M. Schmidt, B. Hellwig, S. Hammad et al. // Clinical Cancer Research– 2012. – Vol. 18, N 9. – P. 2695-2703. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2210.

185. Schwartz, M. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis / M. Schwartz, Y. Zhang, J.D. Rosenblatt // The Journal for ImmunoTherapy of Cancer. –2016. – Vol. 4. – P. 40. doi: 10.1186/s40425-016-0145-x.

186. Siegers, G.M. Functional Plasticity of Gamma Delta T Cells and Breast Tumor Targets in Hypoxia / G.M. Siegers, I. Dutta, R. Lai, L.-M. Postovit // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – P. 1367. doi: 10.3389/fimmu.2018.01367.

187. Silva-Santos, B.  $\gamma\delta$  T cells in cancer / B. Silva-Santos, K. Serre, H. Norell // Nature Reviews Immunology. – 2015. – Vol. 15, N 11. – P. 683-691. doi: 10.1038/nri3904.

188. Sivori, S. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation / S.Sivori, M. Vitale, L. Morelli et al. // Journal of Experimental Medicine. –1997. – Vol. 186, N 7. – P. 1129-1136.doi: 10.1084/jem.186.7.1129.

189. Sivori, S. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and

dendritic cells /S. Sivori, M. Falco, M. Della Chiesa et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, N 27. – P. 10116-10121. doi: 10.1073/pnas.0403744101.

190. 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. Baietalet al. // Clinical Cancer Research– 2003. – Vol. 9, N 1. P. 74-80.

191. Song, G. Elevated level of peripheral CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy / G. Song, X. Wang, J. Jia et al. // Cancer Immunology, Immunotherapy. – 2013. – Vol. 62, N 6. – P. 1123-1130. doi: 10.1007/s00262-013-1424-8.

192. Stanton, S.E. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer / S.E. Stanton, M.L. Disis // The Journal for ImmunoTherapy of Cancer. – 2016. – Vol. 4. – P. 59. doi: 10.1186/s40425-016-0165-6.

193. Sugie, T. Zoledronic acid induced expansion of gammadelta T cells from early-stage breast cancer patients: effect of IL-18 on helper NK cells / T. Sugie, K. Murata-Hirai, M. Iwasaki et al. // Cancer Immunology, Immunotherapy. – 2013. – Vol. 62, N 4. – P. 677-687. doi: 10.1007/s00262-012-1368-4.

194. Sun, J.C. Re-educating natural killer cells / J.C. Sun // Journal of Experimental Medicine. – 2010. – Vol. 207, N 10. – P. 2049-2052. doi: 10.1084/jem.20101748.

195. Sun, J.C. Homeostatic proliferation generates long-lived natural killer cells that respond against viral infection / J.C. Sun, J.N. Beilke, N.A. Bezman, L.L. Lanier. // Journal of Experimental Medicine. – 2011. – Vol. 208, N 2. – P. 357-368. doi: 10.1084/jem.20100479.

196. Suttmuller, R.P. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation / R.P. Suttmuller, M.E. Morgan, M.G. Netea et al. // Trends in Immunology. – 2006. – Vol. 27, N 8. – P. 387-393. doi: 10.1016/j.it.2006.06.005.

197. Szczerba, B.M. Neutrophils escort circulating tumor cells to enable cell cycle progression / B.M. Szczerba, F. Castro-Giner, M. Vetter et al. // *Ature Cell Biology*. – 2019. – Vol. 566, N 7745. – P. 553-557. doi: 10.1038/s41586-019-0915-y.

198. Takahashi, E. Induction of CD16<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD162<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK cells but also from CD162<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK cells / E. Takahashi, N. Kuranaga, K. Satoh et al. // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 65, N 2. – P. 126-138. doi: 10.1111/j.1365-3083.2006.01883.x.

199. Tarakhovsky, A. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection / A. Tarakhovsky, S.B. Kanner, J. Hombach et al. // *Science*. – 1995. – Vol. 269, N 5223. – P. 535-537. doi: 10.1126/science.7542801.

200. Templeton, A.J. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systemic review and meta-analysis / A.J. Templeton, M.G. McNamara, B. Seruga et al. // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2014. – Vol. 106, N 6. – dju124. doi: 10.1093/jnci/dju124.

201. Thorén, F.B. The CD162/CD56<sup>bright</sup> subset of NK cells is resistant to oxidant-induced cell death / F.B. Thorén, A.I. Romero, S. Hermodsson, K. Hellstrand // *Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 179, N 2. – P. 781-785. doi: 10.4049/jimmunol.179.2.781.

202. Tian, W. A prognostic risk model for patients with triple negative breast cancer based on stromal natural killer cells, tumor-associated macrophages and growth-arrest specific protein 6 / W. Tian, L. Wang, L. Yuan et al. // *Cancer Science*. – 2016. – Vol. 107, N 7. – P. 882-889. doi: 10.1111/cas.12964.

203. Triki, H. CD155 expression in human breast cancer: clinical significance and relevance to natural killer cell infiltration / H. Triki, S. Charfi, L. Bouzidi et al. // *Life Science*. – 2019. – Vol. 231. – P. 116543. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116543.

204. Tsuda, B. B-cell populations are expanded in breast cancer patients compared with healthy controls / B. Tsuda, A. Miyamoto, K. Yokoyama et al. // *Breast Cancer*. – 2018. – Vol. 25, N 3. – P. 284-291. doi: 10.1007/s12282-017-0824-6.

205. Upadhye, A. Diversification and CXCR4-Dependent Establishment of the Bone Marrow B-1a Cell Pool Governs Atheroprotective IgM Production Linked to Human Coronary Atherosclerosis / A. Upadhye, P. Sriakulapu, A. Gonen et al. // *Circulation Research*. – 2019. – Vol. 125, N 10. – P. 55-70. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315786.

206. Varambally, S. Natural human polyreactive IgM induce apoptosis of lymphoid cell lines and human peripheral blood mononuclear cells / S. Varambally, Y. Bar-Dayan, J. Bayry et al. // *International Immunology*. – 2004. – Vol. 16, N 3. – P. 517-524 doi: 10.1093/intimm/dxh053.

207. Varchetta, S. Elements Related to Heterogeneity of Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity in Patients Under Trastuzumab Therapy for Primary Operable Breast Cancer Overexpressing Her2 / S. Varchetta, N. Gibelli, B. Oliviero et al. // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, N 24. – P. 11991-11999. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2068.

208. Verma, C. Natural killer (NK) cell profiles in blood and tumour in women with large and locally advanced breast cancer (LLABC) and their contribution to a pathological complete response (PCR) in the tumour following neoadjuvant chemotherapy (NAC): differential restoration of blood profiles by NAC and surgery / C. Verma, V. Kaewkangsan, J.M. Eremin et al. // *Journal of Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 13, N 1. – P. 1-21, 180. doi: 10.1186/s12967-015-0535-8.

209. Verronèse, E. Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multiparametric flow cytometry assay / E. Verronèse, A. Delgado, J. Valladeau-Guilemondet et al. // *Oncoimmunology*. – 2016. – Vol. 5, N 3. – e1100791. doi: 10.1080/2162402X.2015.1100791.

210. Vgenopoulou, S. Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherspecified type / S. Vgenopoulou, A.C. Lazaris, C. Markopoulos et al. // *Breast*. – 2003. – Vol. 12, N 3. – P. 172-178. doi: 10.1016/s0960-9776(03)00004-3.

211. Vitale, M. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility

complex-restricted tumor cell lysis / M. Vitale, C. Bottino, S. Sivori et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 1998. – Vol. 187, N 12. – P. 2065-2072. doi: 10.1084/jem.187.12.2065.

212. Vitale, M. The small subset of CD56<sup>bright</sup>CD162 natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon- $\gamma$  production upon interaction with dendritic cells / M. Vitale, M. Della Chiesa, S. Carlomagno et al. // *European Journal of Immunology*. – 2004. – Vol. 34, N 6. – P. 1715-1722. doi: 10.1002/eji.200425100.

213. Vivier, E. Functions of natural killer cells / E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin et al. // *Nature Immunology*. – 2008. – Vol. 9, N 5. – P. 503-510. doi: 10.1038/ni1582.

214. Vivier, E. The evolution of innate lymphoid cells / E. Vivier, S.A. van de Pavert, M.D. Cooper, G.T. Belz // *Nature Immunology*. – 2016. – Vol. 17, N 7. – P. 790-794. doi: 10.1038/ni.3459.

215. Wagtmann, N. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains / N. Wagtmann, R. Biassoni, C. Cantoniet al. // *Immunity*. – 1995. – Vol. 2, N 5. – P. 439-449. doi: 10.1016/1074-7613(95)90025-x.

216. Wang, B. Metastatic consequences of immune escape from NK cell cytotoxicity by human breast cancer stem cells / B. Wang, Q. Wang, Z. Wanget al. // *Cancer Research*. – 2014. – Vol. 74, N 20. – P. 5746-5757. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2563.

217. Wasserman, R. Down-regulation of terminal deoxynucleotidyl transferase by Ig heavy chain in B lineage cells / R. Wasserman, Y.S. Li, R.R. Hardy // *Journal of Immunology*. – 1997. – Vol. 158, N 3. – P. 1133-1138.

218. Wei, B. The neutrophil to lymphocyte ratio is associated with breast cancer prognosis: an updated systematic review and meta-analysis / B. Wei, M. Yao, C. Xing et al. // *OncoTargets and Therapy*. – 2016. – Vol. 9. – P. 5567-5575. doi: 10.2147/OTT.S108419.

219. Wei, X. Regulatory B cells contribute to the impaired antitumor immunity in ovarian cancer patients / X. Wei, Y. Jin, Y. Tian et al. // *Tumour Biology*. – 2016. – Vol. 37, N 5. – P. 6581-6588. doi: 10.1007/s13277-015-4538-0.
220. Willcox, C.R. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor / C.R. Willcox, V. Pitard, S. Netzer et al. // *Nature Immunology*. – 2012. – Vol. 13, N 9. – P. 872-879. doi: 10.1038/ni.2394.
221. Wolff, A.C. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: ASCO/CAP clinical practice guideline update / A.C. Wolff, E.H. Hammond, D.G. Hicks et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 31, N 31. – P. 3997-4014. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984.
222. Wong, J.B. B-1a cells acquire their unique characteristics by bypassing the pre-BCR selection stage / J.B. Wong, S.L. Hewitt, L.M. Heltemes-Harris // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 4768. doi: 10.1038/s41467-019-12824-z.
223. Wu, Y.L. Gammadelta T cells and their potential for immunotherapy / Y.L. Wu, Y.P. Ding, Y. Tanaka et al. // *International Journal of Biological Sciences*. – 2014. – Vol. 10, N 2. – P. 119-135. doi: 10.7150/ijbs.7823.
224. Wu, Y. Enhanced circulating ILC2s and MDSCs may contribute to ensure maintenance of Th2 predominant in patients with lung cancer / Y. Wu, Y. Yan, Z. Su et al. // *Molecular Medicine Reports*. – 2017. – Vol. 15, N 6. – P. 4374-4381. doi: 10.3892/mmr.2017.6537.
225. Xiang, Z. Dual Face of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T Cells in Tumor Immunology: Anti-versus Pro-Tumoral Activities / Z. Xiang, W. Tu // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1041. doi: 10.3389/fimmu.2017.01041.
226. Yanaba, K. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses / K. Yanaba, J.-D. Bouaziz, K.M. Haas et al. // *Immunity*. – 2008. – Vol. 28, N 5. – P. 639-650. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.017.

227. Yang, Y. Distinct mechanisms define murine B cell lineage immunoglobulin heavy chain (IgH) repertoires / Y. Yang, C. Wang, Q. Yang et al. // *Elife*. – 2015. – Vol. 4. – e09083. doi: 10.7554/eLife.09083.

228. Ye, J. Tumor-derived gammadelta regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence / J. Ye, C. Ma, E.C. Hsueh et al. // *Journal of Immunology*. – 2013. – Vol. 190, N 5. – P. 2403-2414. doi: 10.4049/jimmunol.1202369.

229. Ye, J. Specific recruitment of gammadelta regulatory T cells in human breast cancer / J. Ye, C. Ma, F. Wang et al. // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73, N 20. – P. 6137-6148. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0348.

230. Yoshimoto, M. The ontogeny of murine B-1a cells / M. Yoshimoto // *International Journal of Hematology*. – 2020. – Vol. 111, N 5. – P. 622-627. doi: 10.1007/s12185-019-02787-8.

231. Zarife, M.A. Increased frequency of CD56<sup>Bright</sup> NK-cells, CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> NK-cells and activated CD4<sup>+</sup>T-cells or B-cells in parallel with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> T-cells control potentially viremia in blood donors with HCV / M.A.Zarife, E.A. Reis, T.M. Carmo et al. // *Journal of Medical Virology*. – 2009. – Vol. 81, N 1. – P. 49-59. doi: 10.1002/jmv.21340.

232. Zhang, C. CD5 binds to interleukin-6 and induces a feed-forward loop with the transcription factor STAT3 in B cells to promote cancer / C. Zhang, H. Xin, W. Zhang et al. // *Immunity*. – 2016. – Vol. 44, N 4. – P. 913-923. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.003.

233. Zhang, B. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer / B.Zhang, M. Cao, Y.He et al. // *Tumor Biology*. – 2017. – Vol. 39, N 6:101042831771157. doi: 10.1177/1010428317711571.

234. Zhang, S. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Natural Killer Cells in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis / S. Zhang, W. Liu, B. Hu et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1242. doi: 10.3389/fimmu.2020.01242.

235. Zhao, Y. Gamma-delta (gammadelta) T cells: friend or foe in cancer development? / Y. Zhao, C. Niu, J. Cui // *Journal of Translational Medicine*. – 2018. – Vol. 16, N 1. – P. 3. doi: 10.1186/s12967-017-1378-2.

236. Zhou, X. CD19+ IL-10+ regulatory B cells affect survival of tongue squamous cell carcinoma patients and induce resting CD4+ T cells to CD4+ Foxp3+ regulatory T cells / X. Zhou, Y.X. Su, X.M. Lao et al. // *Oral Oncology*. – 2016. – Vol. 53. – P. 27-35. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.11.003.

237. Zhu, S. CD21lo/medCD27+ proinflammatory B cells are enriched in breast cancer patients and promote antitumor T cell responses / S. Zhu, X. Wang, J. Wang et al. // *Experimental Cell Research*. – 2017. – Vol. 361, N 1. – P. 149-154. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.10.013.

238. Zilio, S. Neutrophils and granulocytic MDSC: the Janus god of cancer immunotherapy / S. Zilio, P. Serafini // *Vaccines*. – 2016. – Vol. 4, N 3. – P. 31. doi: 10.3390/vaccines4030031.

239. Zotto, G.D. Markers and Function of Human NK Cells in Normal and Pathological Conditions / G.D.Zotto, E.Marcenaro, P. Vacca et al. // *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. – 2017. – Vol. 92, N 2. – P. 100-114. doi: 10.1002/cyto.b.21508.

240. Zysk, A. Adoptive transfer of ex vivo expanded Vgamma9Vdelta2 T cells in combination with zoledronic acid inhibits cancer growth and limits osteolysis in a murine model of osteolytic breast cancer / A. Zysk, M.O. De Nichilo, V. Panagopoulos et al. // *Cancer letters*. – 2017. – Vol. 386. – P. 141-150. doi: 10.1016/j.canlet.2016.11.013.

---