

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616.–006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

**Основан в 2006 году
1/2009, Том 6**

Учредитель: РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН (лаборатория иммунологии гемопоэза)

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Н.Н. ТУПИЦЫН, G. JANOSSY
Ответственный секретарь А.В. Моженкова

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)

Е.Г. Турнянская (Москва)

Е.В. Артамонова (Москва)

Ж. Брошье (Франция)

Дж. Вижденес (Франция)

Л.Ю. Гривцова (Москва)

Дж. Джаносси (Великобритания)

И.С. Долгополов (Москва)

Т.Н. Заботина (Москва)

А.М. Ковригина (Москва)

А.М. Копылов (Москва)

Л.В. Мазурок (Курган)

А.А. Михайлова (Москва)

Д.Ш. Османов (Москва)

А.И. Павловская (Москва)

С.В. Петров (Казань)

Б.В. Пинегин (Москва)

А.В. Попа (Москва)

Н.А. Пробатова (Москва)

Р.М. Рамазанова (Казахстан)

И.Н. Серебрякова (Москва)

Г.С. Тумян (Москва)

С.А. Тюляндин (Москва)

А.В. Филатов (Москва)

М.А. Френкель (Москва)

С.А. Шинкарев (Липецк)

Е.Н. Шолохова (Москва)

А.А. Ярилин (Москва)

Адрес редакции: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
Тел./факс 324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия.

Свидетельство ПИ № ФС 77-23551 от 06.03.2006

Свидетельство Эл № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Подписной индекс № 36915

Отпечатано в типографии «Огни Москвы»

Тираж 1000 экз.

При перепечатке материалов ссылка на «Иммунологию гемопоэза» обязательна
Издательская группа РОНЦ
Координатор: Е.Г. Турнянская. Макет: Б.Б. Крюков

HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY

UDK 616.–006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

**Founded in 2006
1/2009, Vol. 6**

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation (HAematopoiesis Immunology Laboratory)

EDITORS-IN-CHIEF N.N.TUPITSYN, G. JANOSSY
Executive secretary A.V. Mozhenkova

Editorial Board:

Z.G. Kadagidze (Deputy Editor-in-Chief)

E.G. Turnianskaia (Moscow)

E.V. Artamonova (Moscow)

J. Brochie (France)

G. Wijdenes (France)

L.U. Grivtsova (Moscow)

G. Janossy (UK)

I.S. Dolgopopol (Moscow)

T.N. Zabolina (Moscow)

A. M. Kovrigina (Moscow)

A.M. Kopilov (Moscow)

L. V. Mazurok (Kurgan)

A.A. Mikhailova (Moscow)

D.Ch. Osmanov (Moscow)

A.I. Pavlovskaja (Moscow)

S. V. Petrov (Kazan)

B.V. Pinegin (Moscow)

A.V. Popa (Moscow)

N.A. Probatova (Moscow)

R.M. Ramazanova (Kazakhstan)

I.N. Serebriakova (Moscow)

G.S. Tumian (Moscow)

S.A. Tuliandin (Moscow)

A.V. Filatov (Moscow)

M.A. Frenkel (Moscow)

S.A. Shinkarev (Lipetzsk)

E.N. Sholokhova (Moscow)

A.A. Iarilin (Moscow)

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478. Tel/fax 324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

The journal is registered at the Federal Agency of Press and Mass-media of Russian Federation.

License № ФС 77-23551 от 06.03.2006

License № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Zip-code № 36915

Published «Ogni Moskvyy»

Printrun 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal Haematopoiesis immunology
Co-ordinator: E.G. Tumyanskaya. Maker: B.B. Krukov

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТ РЕДАКТОРА

Е.В. Артамонова

**РОЛЬ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....8**

А.В. Субботина, В.П. Летягин, Н.Н. Тупицын, В.Д. Ермилова, И.В. Высоцкая

**РОЛЬ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ.....52**

Е.М. Трещалина, И.Д. Трещалин.

ПУШКИН И БРУНИ.....79

**ПРОГРАММА 6-й Российской конференции с международным участием
«ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА», 7-8 июня 2009**

**Организация 6-й Российской с международным участием конференции
«Иммунология гемопоэза» и публикация данного тома периодического
издания «Иммунология гемопоэза» поддержаны Российским фондом фун-
даментальных исследований грант № 09-04-06057-г**

CONTENTS

FROM THE EDITOR

E.V. Artamonova

**THE ROLE OF TUMOR CELL IMMUNOPHENOTYPING IN THE
DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF BREAST CANCER.....8**

A.A. Subbotina, V.P. Letyagin, N.N. Tupitsyn, V.D. Ermilova, I.V. Vysotskaya

**THE ROLE OF BREAST CANCER IMMUNOPHENOTYPING DURING
NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY.....52**

**PROGRAMME of the 6th Russian Conference with International Participation
“HÆMATOPOÏESIS IMMUNOLOGY”, June 7-8, 2009**

ОТ РЕДАКТОРА

Конференция «Иммунология гемопоэза» всегда проводится 6 июня в день основания лаборатории иммунологии гемопоэза и день рождения А.С. Пушкина. 2009-й год юбилейный – 210 лет со дня рождения великого поэта. По этой причине мы сочли возможным посвятить отдельную публикацию неизвестным страницам создания памятника Александру Сергеевичу Пушкину в Ухте.

В настоящем номере мы продолжаем традицию публиковать завершённые работы по материалам кандидатских и докторских диссертаций. Статья доктора медицинских наук, ведущего научного сотрудника Елены Владимировны Артамоновой даёт исчерпывающую информацию о клиническом значении иммунофенотипирования рака молочной железы.

В работе А.А. Субботиной впервые показано, что иммунофенотип рака молочной железы имеет прямое отношение к чувствительности или резистентности опухоли к неоадьювантной химиотерапии. С учетом ранее опубликованных работ по иммунологическому стадированию рака молочной железы (Иммунология гемопоэза/*Hæmatopoïesis Immunology* №2/2007-№1/2008) создается целостное представление о значении иммунофенотипа опухоли в диагностике и прогнозе этого заболевания. Вместе с тем, следует отметить, что в клинике учет этих данных при выборе тактики ведения больного осуществляется далеко не всегда. Отсюда, основной вопрос – это трансляция экспериментальных данных в клинику, в практическую лечебную работу.

Одним из приоритетных направлений исследований лаборатории иммунологии гемопоэза является исследование стволовых клеток в процессе их мобилизации, аутологичной и аллогенной трансплантации. Иммунологический мониторинг в процессе аллогенной трансплантации играет важную роль, и этому вопросу посвящена лекция профессор П.Теразаки на 6-й конференции «Иммунология гемопоэза».

*Главный редактор журнала,
профессор Н.Н.Тулицын*

FROM THE EDITOR

The Hæmatopoïesis Immunology Conference is always held on the 6th of June, the foundation day of the HÆmatopoïesis Immunology Laboratory and A.S. Pushkin's birthday. 2009 is a jubilee year – 210 years from the great poet's birthday. We therefore found it possible to dedicate a special publication to unknown pages of setting up a monument to Alexander Sergeyevich in the town of Ukhta.

This issue continues the tradition to publish accomplished presentations based on materials of PhD and MD theses. The presentation by Elena Vladimirovna Artamonova, MD, leading research scientist, provides full information about clinical impact of breast cancer immunophenotyping. The A.#A. Subbotina's presentation is the first to demonstrate that breast cancer immunophenotype is directly related with tumor response or resistance to neoadjuvant chemotherapy. These articles together with our publications on breast cancer immunophenotyping (*Hæmatopoïesis Immunology* Nos. 2/2007 — 1/2008) provide an integral insight in the significance of tumor immunophenotype for breast cancer diagnosis and prognosis. However, clinicians do not always consider these data when choosing treatment strategy. The principle problem is therefore to translate the experimental findings into the clinical practice, to make them treatment routine.

Study of stem cells during mobilization, auto- or allogenic transplantation is a top priority field of research at the Hematopoiesis Immunology Laboratory. Immunologic monitoring during allogenic transplantation plays an important role and is the main issue of Professor P. Terazaki's report at the 6th Hæmatopoïesis Immunology Conference.

N.N. Tupitsyn
Professor
Editor-in-Chief

ПРОГРАММА
VI Ежегодной Российской
конференции
с международным участием

«ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА»
(РАБОЧИЕ ЯЗЫКИ КОНФЕРЕНЦИИ – РУССКИЙ
И АНГЛИЙСКИЙ, СИНХРОННЫЙ ПЕРЕВОД)

7-8 июня 2009

Председатели:
Профессор G.Janossy (London, UK)
Профессор Н.Н.Тупицын (председатель-
координатор)
Профессор З.Г. Кадагидзе,
Professor Paul Terasaki (USA)

Место проведения:
Российский онкологический центр имени Н.Н.Блохина РАМН
(Конференц-зал клиники)
Москва, Каширское шоссе, 23

7 июня, 2009 – Регистрация участников

8 июня, 2009

9:00-10:00 *Регистрация, открытие конференции*

Вступительное слово директора РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН,
академика РАН и РАМН профессора М.И. Давыдова

Вступительное слово профессора З.Г. Кадагидзе

10:00-13:00 *Утреннее заседание "Аллогенная трансплантация
гемопоэтической ткани в онкологии"*

Председатели:

Профессор З.Г. Кадагидзе, Professor Paul Terasaki (USA),

Профессор Г.Л. Менткевич

10:00-10:30 Professor Paul Terasaki "Basics in bone marrow transplantation"

10:30-10:50 Профессор Г.Л. Менткевич, Н.Н.Субботина "Роль определения
химеризма после трансплантации стволовых гемопоэтических клеток в дет-
ской онкологии"

10:50-11:10 Канд. мед.наук К.Н. Мелкова "Трансплантация стимулированно-
го аллогенного костного мозга в онкологии"

11:10-11:30 Канд. мед. наук Л.Ю. Гривцова "Иммунологические особенности
мобилизованных ранних стволовых гемопоэтических клеток здоровых лиц"

11:30-11:50 Дискуссия

11:50-12:10 *Перерыв. Кофе*

12:10-13:30 *Дневное заседание "Общие вопросы иммунологии опухолей"*

Председатели:

Professor G. Janossy (UK), Профессор Н.Н.Тупицын

12:10-12:30 Профессор З.Г. Кадагидзе "Иммуномониторинг в ходе иммуно-
терапии онкологических больных"

12:30-13:15 Professor G. Janossy (London, UK) "T-cell development and malignancies: recent results"

13:15-13:35 Профессор Н.Н.Тупицын "Перспективы иммунокоррекции гумо-
рального иммунитета у больных раком молочной железы"

13:35-13:45 Проф. Н.В.Бовин "Гликановые антигены раковых клеток и анти-
тела к ним в диагностике рака"

13:45-14:30 *ОБЕД*

14:30-17:00 *Вечернее заседание: "Перспективные направления иммунологии
и молекулярной диагностики опухолей"*

Председатели:

Д.м.н. Е.В.Артамонова, Проф. С.О.Подвизников, Проф. М.А.Френкель

14:30-14:50 Докт.мед.наук Е.В.Артамонова "Фундаментальные аспекты им-
мунофенотипа рака молочной железы"

14:50-15:10 Канд. мед. наук А.Свиридов "Субпопуляции В-лимфоцитов у
больных раком желудка"

15:10-15:30 А.А.Субботина "Иммунологические основы чувствительности
рака молочной железы к химиотерапии"

15:30-15:50 Е.Г.Тимонина "Гемопоз у больных плоскоклеточным раком го-
ловы и шеи"

15:50-17:00 Общая дискуссия. Закрытие конференции

Е.В. Артамонова

РОЛЬ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме

Исследование опухолевых и иммунокомпетентных клеток проведено на гистологических срезах опухолей 239 больных раком молочной железы. Показано, что иммунофенотипические особенности клеток рака молочной железы взаимосвязаны с уровнями местных иммунных реакций (субпопуляциями интратуморальных лимфоцитов), клиническим течением и прогнозом заболевания. Экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II классов клетками рака молочной железы достоверно взаимосвязана между собой и с экспрессией молекул адгезии CD29. Снижение экспрессии молекул HLA клетками рака молочной железы сопровождается достоверным снижением инфильтрации опухоли по большинству субпопуляций иммунокомпетентных клеток. При отсутствии молекул HLA-DR на опухолевых клетках метастазы в регионарные лимфатические узлы выявляются достоверно чаще, чем при наличии HLA-DR. Экспрессия мономорфных детерминант HLA-I и II классов не имеет прямого прогностического значения, однако влияет на прогноз опосредованно, достоверно коррелируя с повышением инфильтрации опухоли CD45⁺CD8⁺ лимфоцитами, уровни которых, в свою очередь, связаны с прогнозом. Экспрессия рецептора трансферрина (CD71) клетками рака молочной железы не взаимосвязана с другими антигенами опухолевых клеток и лимфоидной инфильтрацией опухоли. Отсутствие CD71 является благоприятным фактором и сопровождается достоверным уменьшением частоты метастатического поражения регионарных лимфатических узлов, а также улучшением показателей общей и безрецидивной выживаемости как N₀, так и N⁺ больных раком молочной железы. РЭА-позитивный рак молочной железы характеризуется низкими уровнями лимфоидной инфильтрации опухоли Т-клетками (CD45⁺ CD7⁺), повышением метастазирования в регионарные лимфатические узлы и ухудшением показателей общей и безрецидивной выживаемости в сравнении с РЭА-негативными опухолями. Инфильтрация опухоли клетками иммунной системы происходит, главным образом, за счет Т-лимфоцитов (CD4 и CD8), в меньшей степени – за счет макрофагов, плазмочитов, В-лимфоцитов. Уровни различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток взаимосвязаны друг с другом. Инфильтрация опухоли CD45⁺, CD7⁺, CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитами отрицательно коррелирует с размером опухоли, наличием регионарных метастазов и стадией заболевания. Увеличение уровней интратуморальных CD8⁺ CD45⁺ клеток является фактором благоприятного прогноза у больных раком молочной железы, преимущественно при отсутствии метастазов в регионарные лимфатические узлы.

E.V. Artamonova

THE ROLE OF TUMOR CELL IMMUNOPHENOTYPING IN THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF BREAST CANCER

Abstract

We studied tumor and immunocompetent cells in histologic tumor sections from 239 patients with breast cancer. Breast cancer immunophenotypic features were found related with intensity of local immune reactions (intratumor lymphocyte subpopulations), disease clinical course and prognosis. Expressions of HLA-I and II molecules were interrelated with each other and related with expression of adhesion molecule CD29. Decreased HLA expression on breast cancer cells was associated with significant reduction in tumor infiltration by most subpopulations of immunocompetent cells. Regional lymph node metastases were detected significantly more frequently in cases without than with HLA-DR expression on cancer cells. Expression of HLA-I and II monomorphous determinants had no direct prognostic impact though influenced the prognosis indirectly and correlated with increased tumor infiltration by CD45⁺ CD8⁺ lymphocytes whose levels were in turn related to the prognosis. Expression of transferrin receptor (CD71) on breast cancer cells was not related with expression of other tumor cell antigens or lymphoid tumor infiltration. The absence of CD71 was a good prognostic factor and was associated with a significant reduction in frequency of metastatic involvement of regional lymph nodes and with increased overall and disease-free survival rates both in N₀ and N⁺ breast cancer cases. CEA-positive breast cancers had low levels of lymphoid tumor infiltration by T-cells (CD45⁺ CD7⁺), were associated with increased metastasis and reduced overall and disease-free survival as compared to CEA-negative tumors. Tumor infiltration by immunity cells was mainly due to T-lymphocytes (CD4 and CD8) and to a lower degree to macrophages, plasmacytes, B-lymphocytes. Levels of various immunocompetent subpopulations were interrelated. Tumor infiltration by CD45⁺, CD7⁺, CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes was negatively correlated with tumor size, the presence of regional lymph node metastases and disease stage. Increased level of intratumor CD8⁺ CD45⁺ cells was a good prognostic factor in breast cancer mainly in node-negative patients.

Муциноподобный антиген MUC1 (эпитоп ICO-25) в подавляющем большинстве случаев обнаруживается на клетках рака молочной железы, взаимосвязан с РЭА и не коррелирует со степенью распространенности опухолевого процесса и прогнозом заболевания.

Ключевые слова: РМЖ, иммунофенотип, диагностика, прогноз.

Введение

В России рак молочной железы занимает 1 место в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований у женщин. Число заболевших увеличилось с 31,9 тыс. (1991 г.) до 45,8 тыс. (2002 г.), 5-летняя выживаемость в Москве и Санкт–Петербурге составляет 59,6–59,3%, а среди вновь выявленных больных около 35% имеют III–IV стадии заболевания. У 50% больных раком молочной железы возникают отдаленные метастазы, медиана выживаемости пациенток с метастатическим раком молочной железы составляет 24–36 мес., и только 15% живут более 5 лет.

Общезвестно, что опухоли, имеющие одинаковую стадию по классификации TNM, зачастую радикально отличаются по агрессивности течения заболевания и чувствительности к проводимой терапии, что объясняется индивидуальными биологическими особенностями конкретной популяции злокачественных клеток (Veronesi U. et al., 1995).

Исследования по определению и характеристике этих биологических особенностей, позволяющих адекватно оценить скорость роста опухоли, специфику ее «поведения», метастатический потенциал и особенности метастазирования, химиорезистентность и т. д., широко ведутся во всем мире, и к настоящему времени число маркеров, определяемых на клетках рака молочной железы человека, достаточно велико. Это рецепторы стероидных гормонов, эпидермального фактора роста, экспрессия Her2/neu, CD 95 (Субботина А.А. и соавт, 2009), Pgr 170 (Енгай Д.А. и соавт., 2008), различные генетические нарушения и многие другие (Герштейн Е.С., 1998; Зборовская И.Б., 1998; Valkamonico F. et al., 2001; Носов Д.А., 2001; Di Leo A. et al., Dowsett M.)

Вместе с тем, существует целая область иммунологически оцениваемых параметров опухоли, пока не нашедших четкого отражения с позиций необходимости их изучения у каждого больного.

Это иммунофенотип опухоли (экспрессия молекул гистосовместимости I и II классов, адгезионных молекул, трансферринового рецептора и т.д.), имеющий прямую взаимосвязь с опухолевой прогрессией и противоопухолевым иммунитетом, а также уровни и субпопуляции иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих рак молочной железы (этот показатель может быть полезен при оценке прогноза и при планировании различных иммунотерапевтических мероприятий).

Mucin-like antigen MUC-1 (ICO-25 epitope) was found on a vast majority of breast cancer cells, was related with CEA and not related with disease advance or prognosis.

Key words: breast cancer, immunophenotype, diagnosis, prognosis.

Introduction

In Russia BC is the commonest malignancy accounting for the highest cancer death rates in females. BC prevalence has increased from 31,900 (1991) to 45,800 (2002), the 5-year survival in Moscow and St. Petersburg is 59.6 and 59.3%; 35% of patients with newly diagnosed BC have stage III and IV disease at presentation. About 50% of BC patients develop distant metastases, median survival in metastatic BC is 24 to 36 months, with only 15% surviving 5 years.

As known, BCs of the same TNM stage often differ dramatically by aggressiveness and response to therapy due to individual biologic features of specific cancer cell populations (U. Veronesi et al., 1995).

Studies aimed to identify and characterize these biologic features that help to adequately assess tumor growth rate, behavior, metastatic potential and pattern of metastatic process, chemoresistance etc., are in progress worldwide, and many markers found on BC cells have been identified. They include steroid hormone receptors, epidermal growth factor, Her2/neu, CD95 expression (A.A. Subbotina et al., 2009), Pgp 170 (D.A. Engai et al., 2008), various genetic abnormalities and many others (E.S. Gershtein, 1998; I.B. Zborovskaya, 1998; F. Valkamonico et al., 2001; D.A. Nosov, 2001; A. Di Leo et al., M. Dowsett).

At the same time there are many immunologically detectable tumor features whose importance in each individual patient is not yet established.

They include tumor immunophenotype (expression of HLA I and II molecules, adhesion molecules, transferrin receptor, etc.) that are directly related with tumor progression and antitumor immunity, as well as with levels and subpopulations of immunocompetent cells infiltrating BC (this parameter may be useful for prognosis and planning of various immunotherapeutic strategies).

Основоположником этого нового направления исследований иммунофенотипа опухолевых клеток является профессор Н.Н.Тупицын. Работы начаты во Всесоюзном онкологическом научном центре (РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН) и успешно продолжают уже более 20 лет (Тупицын Н.Н., 2005; Артамонова Е.В. и соавт., 2005).

Клинические и клинико-экспериментальные работы в области изучения иммунофенотипа первичной опухоли и местного иммунного статуса могут предоставить возможности для улучшения диагностики и дифференциальной диагностики рака молочной железы, для более точного прогнозирования его течения, а также для разработки методов иммунотерапии этого заболевания.

Целью исследования явилось установление роли иммунофенотипирования опухолевых и интраутеральных иммунокомпетентных клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы.

Материалы и методы

Больные и характеристика биопсийного материала

Иммуногистохимическое исследование первичных опухолей проведено на криостатных срезах 239 опухолей молочных желез, полученных в ходе оперативного вмешательства (230) или трепанобиопсии (9) у 239 больных раком молочной железы в возрасте 28–82 лет (медиана – 51 год).

Величина первичной опухоли соответствовала индексу T₁ у 20,5% больных (49), T₂ – у 54,8% (131), T₃ – у 10,0% (24) и T₄ – у 14,6% больных (35). Индекс N₀ установлен у 50,6% пациенток (121), N₁ – у 29,7% (71) и N₂ – у 19,7% пациенток (47). Отдаленные метастазы отсутствовали у 91,6% больных (219). I стадия заболевания диагностирована у 15,1% пациенток (36), IIa – у 35,1% (84), IIb – у 23,0% (55), IIIa – у 9,2% (22), IIIb – у 9,2% (22) и IV – у 8,4% (20) пациенток. Инфильтрирующий протоковый рак выявлен в 71,5% случаев (171), инфильтрирующий дольковый рак – в 9,2% (22), смешанный дольково-протоковый рак – 8,8% (21), тубулярный рак – в 4,2% (10), медуллярный рак – в 2,9% (7), рак с метаплазией – в 1,3% (3), слизистый рак – в 1,3% (3), папиллярный рак – в 0,8% (2).

В группе из 187 радикально оперированных больных проведен анализ ОВ и БРВ. Продолжительность наблюдения за пациентками этой группы (от даты операции до даты последней явки или смерти) составила от 6 до 156+ мес. (медиана – 132 мес.).

I. Иммунофенотипирование опухолевой ткани

Основными реактивами, с помощью которых выполнялось исследование, являлись отечественные и зарубежные моноклональные антитела к антигенам опухолевых и иммунокомпетентных клеток (табл. 1).

Professor N. N. Tupitsyn is the founder of this new field of tumor cell immunophenotypic research. The research have been successfully started at the All-Union Cancer Research Center (N.N. Blokhin RCRC RAMS) and continued for more than two decades (N.N. Tupitsyn, 2005; E.V. Artamonova et al., 2005).

Clinical and experimental clinical study involving immunophenotyping of the primary and analysis of local immune status may improve general and differential diagnosis, provide a more accurate prognosis of disease course and development of immunotherapeutic approaches in BC.

The purpose of this study was to assess the role of immunophenotyping of tumor and intratumoral immunocompetent cells in diagnosis and prognosis of BC.

Materials and methods

Patients and biopsy specimens

Immunohistochemical study was performed on fresh frozen sections of 239 primary BCs (230 surgical specimens and 9 trepan biopsies) from 239 BC patients aged 28 to 82 (median 51) years.

Size of the primary was evaluated as T₁ in 49 (20.5%), T₂ in 131 (54.8%), T₃ in 24 (10.0%) and T₄ in 35 (14.6%) patients. N₀ was diagnosed in 121 (50.6%), N₁ in 71 (29.7%) and N₂ in 47 (19.7%) patients. 219 (91.6%) patients had no distant metastases. Distribution of cases by disease stage was as follows: 36 (15.1%) patients had stage I, 84 (35.1%) had stage IIa, 55 (23.0%) had stage IIb, 22 (9.2%) had stage IIIa, 22 (9.2%) had stage IIIb and 20 (8.4%) had stage IV disease.

Infiltrating ductal carcinoma was discovered in 171 (71.5%), infiltrating lobular carcinoma in 22 (9.2%), mixed lobular–ductal carcinoma in 21 (8.8%), tubular carcinoma in 10 (4.2%), medullary carcinoma in 7 (2.9%), carcinoma with metaplasia in 3 (1.3%), mucous carcinoma in 3 (1.3%) and papillary carcinoma in 2 (0.8%) patients.

Analysis of overall (OS) and disease-free (DFS) survival was performed in 187 patients undergoing curative treatment. Follow-up time in this patient group (from the date of surgery to the date of the last assessment or death) was 6 to 156+ months (median 132 months).

I. Tumor tissue immunophenotyping

Most of the study panel consisted of Russian and foreign monoclonal antibodies (MAB) to tumor and immunocompetent cell antigens (table 1).

Таблица 1/Table 1

Специфичность использованных МКА/Specificity of used MCA

№	Специфичность/ Кластер дифференцировки/ Specificity/Klaster of a differentiation	Название МКА/ Name of MCA
I. Антигены опухолевых клеток/Antigens of tumor cells		
1	Egp34	HEA-125
2	РЭА/CEA	HEA-19
3	MUC-1	ICO-25
4	HLA-I	ICO-53
5	HLA-II (HLA-DR)	ICO-1
6	CD29 (VLA-β1)	K-20*
7	CD71 (рецептор трансферрина/ receptor of transferrin)	ICO-92
II. Антигены иммунокомпетентных клеток/ Antigens of immunocompetent cells		
II.1. Общелейкоцитарные антигены/Common leukocytic antigens		
8	CD45	Bra55, HLe1, ICO-58
II.2. Дифференцировочные антигены Т-лимфоцитов/ Differential antigens of T-lymphocytes		
9	CD5	A50*, ICO-80
10	CD7	I210*, HD49, ICO-87
11	CD4	HP2/6, ICO-86
12	CD8	L533*, ICO-31
II.3. Дифференцировочные антигены В-лимфоцитов/ Differential antigens of B-lymphocytes		
13	CD19	HD37
14	CD37	HD28
II.4. Миеломоноцитарные антигены/Myelomonocitar antigens		
15	CD11b	ICO-GM1
16	CD163	D11
II.5. Линией неограниченные антигены/Nonlinealimited antigens		
17	CD38	ICO-20
Все МКА серии ICO получены д.м.н., проф. А.Ю. Барышниковым; МКА с отметкой * представлены L. Boumsell (Франция) в ходе сотрудничества; МКА серии HEA, HD, HP представлены в ходе сотрудничества с Германией; МКА серии Bra предоставлены Б. Хорват (Братислава) в ходе сотрудничества; МКА D11 получены к.м.н. Т.Д. Рудинской в лаб. иммунохимии (рук. академик РАН, проф. Г.И. Абе-лев) РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН/All MCA ICO-series receipted in prof. A.Yu. Barishnikov laboratory, MCA with * presented L.Boumsell (France) within the framework of scientific cooperation; MCA HEA, HD, HP with * presented L.Boumsell (France) within the framework of scientific cooperation; MCA HEA, HD, HP series presented within the framework of scientific cooperation with Germany; MCA Bra serie presented B. Chorvat (Bratislava) within the framework of scientific cooperation; MCA D11 receipted T.D. Rudninskiy in immunochemistry laboratory (chef – prof. G.I. Abelev) of CRC RAMS.		

Таблица 2/Table 2

Иммунофенотипическая характеристика рака молочной железы/
Immunophenotypic characteristic of BC

Антиген/ Antigen	Тип реакции: % (кол-во случаев)/ Type of reaction (n of cases)		
	Мономорфный/ Monomorphe	Мозаичный/ Mosaic	Отрицательный/ Negative
Egp34	98,7% (155/157)	1,3% (2/157)	0% (0/157)
MUC-1	56,3% (103/183)	37,7% (69/183)	6,0% (11/183)
РЭА	14,1% (22/156)	15,4% (24/156)	70,5% (110/156)
HLA-I	32,2% (70/217)	24,0% (52/217)	43,8% (95/217)
HLA-DR	8,6% (20/232)	16,4% (38/232)	75,0% (174/232)
CD71	53,7% (88/164)	21,9% (36/164)	24,4% (40/164)
CD29	51,9% (55/106)	23,6% (25/106)	24,5% (26/106)

Таблица 3/Table 3

Безрецидивная выживаемость больных РМЖ в зависимости от экспрессии MUC-1 опухолевыми клетками/Disease-free survival of patients with BC in dependence of expression of MUC-1 in cancer cells

Экспрессия MUC-1 (n больных)/ Expression of MUC-1 (n of patients)	Безрецидивная выживаемость/ Disease-free survival		
	5 лет/years %±m	10 лет %±m	Медиана/Mediane
Отсутствует/ Absent (8)	70,0±18,2	—	не достигнута/ not achieved
Мозаичная/ Mosaic (59)	63,5±6,4	56,0±7,5	не достигнута/ not achieved
Мономорфная/ Monomorphe (82)	51,1±5,8	41,6±6,8	72 мес./months

Таблица 4/Table 4

Связь регионарного метастазирования с экспрессией РЭА/
Communications of regional metastasing with expression of CEA

Метастазы в лимфоузлы/M etastases in lymph nodes	Фенотип опухоли/ (кол-во – %)/ Phenotype of tumor (n – %)			Всего (кол-во – %)/ Total (n – %)
	РЭА+/CEA+	РЭА±/CEA±	РЭА–/CEA–	
Нет/Negative	7 – 31,8%	9 – 37,5%	71 – 64,5%	87 – 55,8%
Есть/Positive	15 – 68,2%	15 – 62,5%	39 – 35,5%	69 – 44,2%
Всего/Total	22 – 100%	24 – 100%	110 – 100%	156 – 100%
$\chi^2=11,798$; $p=0,003$				

Исследование проведено непрямым иммуофлуоресцентным методом на криостатных срезах опухолевой ткани. Учет проводили на люминисцентном микроскопе Leitz Orthoplan или Axioplan (Германия) при увеличении объектива $\times 25$ или $\times 40$, окуляра $\times 10$. При иммунофенотипировании опухолевых клеток результаты реакции учитывали полуколичественным методом, предложенным Hammerling et al. (1987).

Выделяли **3 типа взаимодействия антител с опухолевыми клетками**:

- **отрицательная реакция** – менее 10% антигенположительных опухолевых клеток;
- **мозаичная реакция** – антиген присутствует на части (от 10 до 80%) опухолевых клеток;
- **мономорфная реакция** – антиген экспрессируется большинством (более 80%) опухолевых клеток.

При **иммунофенотипировании иммунокомпетентных клеток в гистологических срезах** опухоли выделяли **3 типа иммунных реакций**, каждую из которых условно оценивали в баллах:

- **отрицательная иммунная реакция** (антигенположительные клетки не определяются или определяется небольшое их количество в препарате) – 0 баллов;
- **умеренный тип иммунной реакции** (умеренное количество антигенположительных клеток, расположенных разрозненно или мелкими группами) – 1 балл;
- **выраженный тип иммунной реакции** (множество антигенположительных клеток в срезе, могут встречаться крупные группы и инфильтраты из этих клеток) – 2 балла.

III. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы SPSS: корреляционный анализ, сравнение средних, анализ по таблицам сопряженности признаков с применением критерия χ^2 , тестов направленных оценок, построение кривых выживаемости по Каплан-Майер и оценка достоверности различий в выживаемости тестами Лог-Ранк, Бреслоу, Тарон-Уоре.

Результаты исследования и обсуждение

I. Иммунофенотип рака молочной железы

Основная часть работы посвящена исследованию иммунофенотипа РМЖ с помощью панели МКА к эпителиальным антигенам (Egp34, MUC-1 и РЭА), молекулам главного комплекса гистосовместимости I и II классов и антигенам кластеров лейкоцитарной дифференцировки (рецептор трансферрина CD71 и молекулы адгезии CD29). Частота различных типов реакции МКА к антигенам опухолевых клеток представлена в табл. 2.

The study involved indirect immunofluorescent assay of fresh frozen sections from tumor tissue. Reactivity was analyzed using a Leitz Orthoplan or Axioplan (Germany) luminescent microscope at magnification $\times 25$ or $\times 40$ (objective glass) and $\times 10$ (ocular glass). Tumor cell immunophenotyping was done by semi-quantitative analysis of staining according to Hammerling et al. (1987).

Three *types of antibody–tumor cell interactions were identified*:

- **negative reaction** was defined as $< 10\%$ of antigen-positive tumor cells;
- **mosaic reaction** as no antigen expression on a part (10 to 80%) of tumor cells;
- **homogeneous reaction** as antigen expression on most ($> 80\%$) of tumor cells.

Immunophenotyping of immunocompetent cells in tumor histological sections identified three levels of immune reactivity, such as

- **negative** (0, no or few antigen-positive cells),
- **moderate** (1, moderate number of antigen-positive cells seen as single cells or small cell clusters),
- **intensive immune reaction** (2, many antigen-positive cells in large groups or infiltrations).

Statistical analysis

Statistical analysis of study findings was made using the SPSS program and included correlation analysis, comparison of means, contingency table analysis by chi-squared test, directed estimate test, Kaplan–Meier survival curves and analysis of differences in survival by long-rank, Breslow, Taron–Ware tests.

Results and discussion

Breast cancer immunophenotyping

The main portion of this study involved BC immunophenotyping using a MAB panel to epithelial antigens (Egp34, MUC-1 and CEA), HLA-I and II molecules and leukocyte differentiation cluster antigens (transferrin receptor CD71 and adhesion molecule CD29). Table 2 demonstrates frequencies of various reactions between the MABs and tumor cell antigens.

Эпителиальные антигены (Egp34, MUC-1, РЭА)

Общезпителиальный антиген Egp34 выявлялся в 100% случаев РМЖ (98,7% мономорфный реакций). Муциноподобный антиген MUC-1 также часто (в 94,0% случаев) выявлялся при РМЖ, однако мономорфный тип реакции отмечен в 56,3% наблюдений.

При оценке взаимосвязи экспрессии различных антигенов клетками рака молочной железы обнаружена значимая положительная корреляция между MUC-1 и РЭА ($\chi^2=14,152$; $p=0,007$): все 100% опухолей, мономорфно экспрессирующих РЭА, мономорфно экспрессировали MUC-1; в РЭА-мозаичной группе мономорфная экспрессия MUC-1 встречалась чаще, чем в РЭА-отрицательной (68,4 и 49,3% соответственно); единственный MUC-1-отрицательный случай был также РЭА-отрицательным.

Экспрессия MUC-1 не была связана со степенью распространенности процесса, оцененной по размеру опухоли, наличию метастазов в регионарные лимфоузлы и стадии заболевания. При изучении безрецидивной выживаемости больных РМЖ в зависимости от наличия MUC-1 на опухолевых клетках отмечена тенденция к снижению БРВ при нарастании экспрессии маркера (различия не достоверны, $p>0,05$), табл. 3.

Аналогичная тенденция отмечена и для общей выживаемости, которая также снижалась при нарастании экспрессии MUC-1: показатель 5-летней ОВ при отрицательной, мозаичной и мономорфной реакции составил $75,0\pm 21,7\%$; $74,8\pm 5,9\%$ и $67,1\pm 5,4\%$ соответственно ($p>0,05$).

Третьим эпителиальным маркером, оцененным нами при РМЖ, был **РЭА**. Он наиболее редко, по сравнению с Egp34 и MUC-1, выявлялся на клетках первичной опухоли (29,5% случаев). Мономорфный тип реакции для него нехарактерен (14,1% наблюдений). При исследовании местных иммунных реакций оказалось, что экспрессия РЭА сопровождалась достоверным снижением инфильтрации опухоли $CD7^+$ Т-лимфоцитами ($\chi^2=12,267$; $p=0,015$), что приводило к снижению общего ($CD45^+$) уровня инфильтрации опухоли ($\chi^2=17,607$; $p=0,001$). Частота выраженной инфильтрации опухоли $CD7^+$ Т-лимфоцитами в группах с РЭА-мономорфным, мозаичным и отрицательным фенотипом составила соответственно 4,5% (1/22); 12,5% (3/24) и 19,1% (21/110), а выраженный общий уровень лейкоцитарной инфильтрации опухоли ($CD45^+$) в группе с мономорфной экспрессией РЭА не встречался. Экспрессия РЭА не была взаимосвязана с размером опухоли ($p=0,551$).

Наличие РЭА на клетках РМЖ сопровождалось достоверным увеличением частоты метастатического поражения регионарных лимфоузлов независимо от количества антигенположительных клеток (мономорфная и мозаичная реакции): метастазы выявлялись в 68,2% случаев РЭА-мономорфной группы, в 62,5% случаев РЭА-мозаичной группы и в 35,5% случаев РЭА-негативной группы (табл. 4).

Epithelial antigens (Egp34, MUC-1, CEA)

Common epithelial antigen Egp34 was found in 100% of BC cases (homogeneous reactions 98.7%). Mucin-like antigen MUC-1 was discovered on BC cells at a similar frequency (94.0%), though homogeneous reaction was seen in 56.3% of cases.

Expressions of MUC-1 and CEA were significantly ($\chi^2=14.152$; $p=0.007$) related: all 100% of tumors with CEA homogeneous expression also demonstrated homogeneous expression of MUC-1; MUC-1 homogeneous expression was seen more frequently in CEA-mosaic than in CEA-negative subgroup (68.4 and 49.3%, respectively); the only MUC-1-negative case was also CEA-negative.

MUC-1 expression was not correlated with disease advance as assessed by tumor size, regional lymph node involvement and disease stage. DFS of BC patients had a declining trend as the marker expression (table 3) was increasing (the difference was not significant, $p>0.05$).

A similar trend was observed for OS that also decreased with increase in MUC-1 expression; the 5-year OS rates for negative, mosaic and homogeneous reactions were $75.0\pm 21.7\%$; $74.8\pm 5.9\%$ and $67.1\pm 5.4\%$, respectively ($p>0.05$).

CEA was the third epithelial marker analyzed in our study. It was expressed on BC cells at the least frequency (29.5%) as compared with Egp34 and MUC-1. Homogeneous reaction was not common for this marker (14.1% of cases). Study of local immune reactions demonstrated that CEA expression was associated with significant fall in tumor infiltration by $CD7^+$ T-lymphocytes ($\chi^2=12.267$; $p=0.015$) leading to decrease in all-lymphocyte ($CD45^+$) infiltration of tumors ($\chi^2=17.607$; $p=0.001$). Respective frequencies of marked tumor infiltration by $CD7^+$ T-lymphocytes in subgroups with CEA-homogeneous, mosaic and negative phenotypes were 4.5% (1/22), 12.5% (3/24) and 19.1% (21/110), while marked levels of all-leukocytic infiltration ($CD45^+$) were not detected in any of the tumors with CEA homogeneous expression. CEA expression was not related with tumor size ($p=0.551$).

The presence of CEA on BC cells was associated with significant increase in regional lymph node involvement irrespective of the number of antigen-positive cells (homogeneous and mosaic staining): metastasis was present in 68.2% of CEA-homogeneous, 62.5% of CEA-mosaic and 35.5% of CEA-negative cases (table 4).

Необходимо отметить, что полученные нами сведения о связи РЭА со снижением уровня иммунного ответа и с увеличением частоты регионарного метастазирования хорошо согласуются между собой, так как дальнейшие исследования показали, что сам по себе низкий уровень инфильтрации опухоли по ряду субпопуляций иммунокомпетентных клеток также является фактором неблагоприятного прогноза.

Наши предположения о более агрессивном клиническом течении опухолей, экспрессирующих РЭА, и возможной неблагоприятной прогностической роли обнаружения этого маркера подтвердились при изучении общей и безрецидивной выживаемости больных (табл. 5). Наихудшие показатели ОБ и БРВ отмечены в группе с мономорфной экспрессией РЭА, промежуточные – в группе мозаичной реакции. Наилучшим прогноз был у больных с отсутствием этого маркера на раковых клетках (различия статистически достоверны).

Антигены главного комплекса гистосовместимости

Антигены HLA I и II классов – высокополиморфные антигены клеточной поверхности, играющие основную роль в развитии и реализации механизмов иммунного распознавания и уничтожения чужеродных (в том числе и опухолевых) клеток.

Мы обнаружили экспрессию HLA-I только в половине случаев рака молочной железы (56,2%). В 32,2% наблюдений отмечена мономорфная реакция; в 24,0% – мозаичная, а 43,8% опухолей были полностью антигеннегативными. HLA-DR обнаруживались нами на клетках рака молочной железы гораздо реже – лишь в 25,0% наблюдений, включая 8,6% мономорфных и 16,4% мозаичных реакций.

При анализе взаимосвязей между различными маркерами на клетках рака молочной железы установлена выраженная положительная взаимосвязь экспрессии HLA I и II классов (табл. 6). Эта взаимосвязь заключалась в том, что в подавляющем большинстве случаев молекулы HLA-DR определялись на мембране при наличии HLA-I. Лишь у 5 больных HLA-I–отрицательные опухоли мозаично (4 случая) и мономорфно (1 случай) экспрессировали HLA-II. Вероятно, существует определенная иерархия в экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости, а индукция молекул HLA-DR на раковых клетках возможна на тех этапах опухолевой прогрессии, когда еще не утрачены детерминанты HLA-I. Косвенным подтверждением сказанному может служить тот факт, что в нормальных тканях человека клетки с фенотипом HLA-I⁺HLA-DR⁺ отсутствуют. При раке молочной железы случай с подобным фенотипом был только один (0,5%). Второе важное наблюдение: антигенный профиль опухолевых клеток существенно отличается от такового нормальной ткани МЖ. Фенотип нормальных эпителиальных клеток во всех случаях соответствует HLA-I⁺HLA-DR⁺.

Of note that our findings about CEA association with decreased immune response and with increased regional lymph node involvement were in a good agreement with each other, because further study demonstrated that low tumor infiltration by some immunocompetent subpopulations was itself a poor prognostic factor.

Analysis of OS and DFS confirmed our hypothesis about more aggressive course of CEA-positive tumors and potentially poor prognostic role of CEA (table 5). The OS and DFS rates were the lowest in the subgroup with CEA homogeneous expression and intermediate in the mosaic staining subgroup. Patients without CEA expression on cancer cells had the best prognosis (differences statistically significant).

Major histocompatibility complex antigens

HLA-I and II antigens are highly polymorphous cell surface antigens that play a key role in development and action of mechanisms for immune recognition and killing of not-self (including tumor) cells.

HLA-I expression was found in half of BC cases (56.2%) only, including 32.2% of tumors with homogeneous and 24.0% with mosaic staining. 43.8% of tumors were fully antigen-negative. HLA-DR was found on BC cells much less frequently, i.e. in 25.0% of tumors including 8.6% with homogeneous and 16.4% with mosaic staining.

Expressions of HLA-I and II were positively correlated (table 6), i.e. HLA-DR molecules were detected in a vast majority of HLA-I-positive tumors. Only 5 HLA-I-negative tumors demonstrated mosaic (4) or homogeneous (1) expression of HLA-II. One may suggest that there is a certain hierarchy in expression of major histocompatibility complex antigens and HLA-DR induction may occur at tumor progression stages when HLA-I determinants are still present. The absence of HLA-I⁺HLA-DR⁺ cells in normal human tissues may indirectly confirm this supposition. This phenotype was found in 1 (0.5%) BC case only. Another important finding is that antigenic profiles of tumor cells and normal breast tissue differ considerably. All normal epithelial cells have the HLA-I⁺HLA-DR⁻ phenotype.

Таблица 5/Table 5

Выживаемость больных РМЖ в зависимости от экспрессии РЭА/

Survival of patients with BC in dependence of CEA expression

Экспрессия РЭА (кол-во б-х)/ CEA expression (n of patients)	Выживаемость/Survival			
	Общая/Total		Безрецидивная/ Disease free	
	5 лет/years %±m	средняя (мес.)/ averages (months) медиана (мес.)/ mediane (months)	5 лет/years %±m	средняя (мес.)/ averages (months) медиана (мес.)/ mediane (months)
Отсутствует/ Absent (84)	83,2±4,5	125,34±6,34 не достигнута/ not achieved	74,3±5,2	114,38±7,49 не достигнута/ not achieved
Мозаичная/ Mosaic (20)	79,7±10,9	94,29±8,4 108 мес./months	60,9±13,2	83,72±11,24 72 мес./months
Мономорфная/ Monomorphe (15)	52,4±14,4	64,69±10,79 72 мес./months	50,0±13,4	44,97±9,32 48 мес./months
Лог-Ранк Тест / Log-Rank Test Бреслоу/ Breslow Test Тарон-Уорс/ Taron-Wore Test	0,0071* 0,0224* 0,0129*		0,0003* 0,0065* 0,0020*	
* – различия статистически достоверны				

Таблица 6/Table 6

Взаимосвязь экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости клетками рака молочной железы/Relationship of expression of antigens head complex of histocompatibility of BC cells

Антиген	H L A – II			
HLA-I	Тип реакции/ Type of reaction Всего/ Total 215 б-х /patients	Мономорфная /Monomorphe 17 б-х 7,9%*	Мозаичная /Mosaic 32 б-х/ patients 14,9%*	Отрицательная /Negative 166 б-х/ patients 77,2%*
	Мономорфная /Monomorphe 69 б-х/ Patients 32,1%*	14 6,5%* 82,4%** 20,3%***	16 7,4%* 50,0%** 23,2%***	39 18,1%* 23,5%** 56,5%***
	Мозаичная /Mosaic 52 б-х/ patients 24,2%*	2 0,9%* 11,8%** 3,8%***	12 5,6%* 37,5%** 23,1%***	38 17,7%* 22,9%** 73,1%***
	Отрицательная /Negative 94 б-х/ patients 43,7%*	1 0,5%* 5,9%** 1,1%***	4 1,9%* 12,5%** 4,2%***	89 41,4%* 53,6%** 94,7%***
* – процент в таблице/percent in table, ** – процент в столбце/percent in column; *** – процент в ряду/percent in rang. $\chi^2=40,365$; p=0,000				

При раке подобный фенотип наблюдался лишь в 18,1% наблюдений, а чаще всего (41,4%) рак молочной железы характеризовался полным отсутствием молекул HLA на опухолевых клетках.

Вместе с тем следует помнить, что наблюдаемые особенности иммунофенотипа клеток рака молочной железы ни в коей мере нельзя относить к разряду опухолеспецифических.

Антиген HLA-DR отсутствует на нормальном “покоящемся” эпителии молочных желез, но легко индуцируется при целом ряде физиологических ситуаций (беременность, лактация), при воспалительных и незлокачественных гиперпластических процессах. Однако во всех этих случаях на клетках сохраняется экспрессия молекул HLA-I.

Экспрессия HLA-I также достоверно положительно коррелировала с выявлением на опухолевых клетках молекул адгезии CD29 ($\chi^2=10,175$; $p=0,038$; $n=105$). В норме на эпителии молочной железы молекулы VLA- β экспрессированы во всех случаях и, следовательно, их утрата может являться косвенным отражением нарушения механизмов адгезии и связанной с этим активацией процессов инвазии и метастазирования.

Если учесть, что оба антигена в норме представлены на всех клетках, определенная синхронность утраты CD29 и HLA-I, характерных для нормального фенотипа, является легко объяснимой с позиций злокачественной трансформации и приобретения раковыми клетками не свойственных нормальному эпителию биологических свойств.

В свою очередь, молекулы HLA-II были достоверно положительно взаимосвязаны с β_1 -цепью интегринов CD29 ($\chi^2=10,080$; $p=0,039$; $n=106$). Все эти данные (включая рассмотренные ранее взаимосвязи) хорошо согласуются между собой и свидетельствуют о существовании четких закономерностей утраты в процессе малигнизации антигенных детерминант, характерных для нормального эпителия или эпителия молочных желез при доброкачественных процессах (к ним относятся антигены главного комплекса гистосовместимости и молекулы адгезии) и появления не свойственных нормальному фенотипу РЭА и цитоплазматического MUC-1.

Мы оценили уровни инфильтрации РМЖ субпопуляциями лимфоцитов и макрофагов в зависимости от экспрессии опухолью молекул HLA-I (табл. 7). Экспрессия HLA-I класса достоверно коррелировала с увеличением инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами ($CD5^+$, $CD7^+$), их субпопуляциями ($CD4^+$, $CD8^+$) и макрофагами ($CD163^+$), что отражалось на увеличении общего уровня инфильтрации ($CD45^+$). Молекулы HLA-I не влияли на реакцию В-лимфоцитов ($CD19^+$, $CD37^+$) и плазматических клеток ($CD38^+$).

Таким образом, полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что в числе прочих факторов, влияющих на уровни инфильтрации рака молочной железы Т-лимфоцитами, существенную роль играет экспрессия молекул гистосовместимости I класса.

It should be noted however that the above-mentioned BC immunophenotypic features cannot be treated as tumor-specific. HLA-DR is absent on normal dormant breast epithelial cells though is easily induced in certain physiological situations (pregnancy, lactation), inflammation and benign hyperplasia. However, HLA-I expression is also present in all of these cases.

HLA-I expression demonstrated a significant positive relationship with adhesion molecules CD29 on tumor cells ($\chi^2=10.175$; $p=0.038$; $n=105$).

VLA- β is always expressed on normal breast epithelial cells and the loss of this molecule may be an indirect evidence of impairment of adhesion mechanisms and the associated activation of invasion and metastasis processes.

If both antigens are present on all normal cells, simultaneous loss of CD29 and HLA-I, characteristic of normal phenotype, is easily explainable in terms of malignant transformation and acquisition of abnormal biological properties by cancer cells.

HLA-II was significantly positively related with β -chain of CD29 integrins ($\chi^2=10.080$; $p=0.039$; $n=106$). All these findings (including previously considered correlations) agree well with each other and are evidence of clear-cut regularities in loss of antigenic determinants characteristic of normal breast epithelium or its benign disorders (including MHC antigens and adhesion molecules) and emergence of CEA and cytoplasmic MUC-1, not seen in normal breast epithelium, in the process of malignization.

We analyzed BC infiltration by lymphocyte subpopulations and macrophages with respect to HLA-I expression on tumor cells (table 7). HLA-I expression demonstrated significant correlation with increased tumor infiltration by T-lymphocytes ($CD5^+$, $CD7^+$), their subpopulations ($CD4^+$, $CD8^+$) and macrophages ($CD163^+$) resulting in increased total infiltration ($CD45^+$). HLA-I had no effect on B-lymphocyte ($CD19^+$, $CD37^+$) or plasmic cell ($CD38^+$) reactivity.

These data therefore provide a strong evidence of HLA-I playing an important role together with other factors influencing T-lymphocytic infiltration in BC.

Роль молекул HLA–DR на раковых клетках во многом сходна с таковой молекул HLA–I с точки зрения опосредования взаимодействия опухоли с иммунной системой. При изучении местных иммунных реакций в группах с HLA–DR–положительным, мозаичным и негативным фенотипами установлено, что экспрессия молекул гистосовместимости II класса при раке молочной железы достоверно коррелирует с увеличением инфильтрации опухоли по большинству субпопуляций иммунокомпетентных клеток (табл. 8).

Отмечена положительная связь с общим уровнем инфильтрации ($CD45^+$), реакцией Т–лимфоцитов ($CD7^+$) и их субпопуляций ($CD4^+$ и $CD8^+$), макрофагов ($CD163^+$), В–лимфоцитов ($CD19^+$ и $CD37^+$) и $CD38^+$ плазматических клеток. Таким образом, в целом экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости клетками рака молочной железы была ассоциирована с достоверным увеличением степени выраженности местных иммунных реакций.

Основным вопросом любого клинического исследования, касающегося фенотипа опухолевых клеток, является оценка влияния того или иного маркера на особенности течения и прогноз заболевания. Нам не удалось обнаружить взаимосвязь молекул HLA–I со степенью распространенности процесса по таким общепринятыми показателям, как величина первичной опухоли, наличие регионарных и отдаленных метастазов и стадия заболевания.

Экспрессия HLA–II также не была взаимосвязана с размером опухоли. Метастатическое поражение регионарных лимфоузлов при HLA–II–негативном фенотипе отмечалось достоверно чаще (53,4%–93/174), чем при HLA–II–позитивных фенотипах (36,2%–21/58 суммарно для мозаичной и мономорфной реакции, $\chi^2=5,174$; $p=0,023$).

Результат оценки прогностического значения антигенов главного комплекса гистосовместимости при раке молочной железы поначалу показался обескураживающим. Мы не нашли различий в показателях общей и безрецидивной выживаемости больных в зависимости от наличия или отсутствия этих детерминант на опухолевых клетках. Однако при проведении дальнейшего анализа оказалось, что выраженный общий уровень $CD45^+$ иммунной реакции, а также выраженный и умеренный уровни инфильтрации опухоли $CD8^+$ цитотоксическими/супрессорными Т–клетками достоверно коррелируют с улучшением выживаемости больных РМЖ без метастазов в регионарные лимфоузлы. Как показали наши исследования, представленные в данном разделе, уровни инфильтрации опухоли $CD45^+$ лейкоцитами и $CD8^+$ Т–лимфоцитами напрямую зависят от экспрессии на раковых клетках антигенов главного комплекса гистосовместимости.

Таким образом, становится очевидным, что утрата молекул HLA в ходе опухолевой прогрессии оказывает неблагоприятное влияние на прогноз опосредованно, приводя к уменьшению интенсивности местной иммунной реакции клеток, которые, судя по фенотипу ($CD45^+CD8^+$ –лимфоциты), могут оказывать киллерное действие в отношении опухоли.

The role of HLA-DR expression on cancer cells is to a large degree similar to that of HLA-I in terms of 'tumor-immune system' interaction. Study of local immune reactions in groups with HLA-DR-positive, mosaic and homogeneous phenotypes demonstrated that expression of class II molecule on BC cells correlated significantly with increased tumor infiltration by most immunocompetent subpopulations (table 8).

There was a positive relationship with all-lymphocyte (CD45⁺) infiltration, reactions of T-lymphocytes (CD7⁺) and their subpopulations (CD4⁺, CD8⁺), macrophages (CD163⁺), B-lymphocytes (CD19⁺, CD37⁺) and CD38⁺ plasmatic cells. Therefore, expression of MHC molecules on BC cells was associated with significant increase in intensity of local reactions.

The main issue of any clinical tumor cell phenotyping is evaluation of the impact of study markers on disease course and prognosis. We failed to establish relationship between HLA-I expression and disease advance as assessed by common criteria such as size of the primary, regional or distant metastasis and disease stage.

HLA-II expression was not related to tumor size either. Metastatic regional lymph node involvement was significantly more frequent in HLA-II-negative (53.4%; 93/174) than in HLA-II-positive (36.2%; 21/58 for a total of mosaic and homogeneous reactions, $\chi^2=5.174$; $p=0.023$) phenotype.

Analysis of prognostic value of MHC antigens in BC at first produced discouraging results. There were no differences in OS or DFS with respect to the presence or absence of these determinants on tumor cells. However, further analysis demonstrated that marked total level of CD45⁺ immune reaction, marked and moderate levels of tumor infiltration by CD8⁺ cytotoxic/suppressor T-cells significantly correlated with improved survival of BC patients free from regional lymph node metastases. As demonstrated by our findings presented in this section, levels of tumor infiltration by CD45⁺ leukocytes and CD8⁺ T-lymphocytes depended directly on MHC expression on BC cells.

Therefore the conclusion may be made that loss of HLA molecules in the course of tumor progression produces a poor effect on the prognosis in an indirect manner, i.e. via reduced intensity of local immune reaction of cells with potential killing activity against tumor cells as may be judged by their phenotype (CD45⁺ CD8⁺ lymphocytes).

Таблица 7/Table 7

Субпопуляции иммунокомпетентных клеток в опухолях с различной экспрессией HLA-I/Subpopulation of immunocompetent cells in tumors with diverse expression of HLA-I

CD	Степень реакции в баллах/ Grade of reaction in balls	Фенотип опухоли/Phenotype of tumor			χ^2 p
		HLA-I+	HLA-I±	HLA-I–	
CD45	2	32/53–60,4%	20/44–45,5%	22/71–31,0%	11,934 0,018*
	1	11/53–20,8%	15/44–34,1%	24/71–33,8%	
	0	10/53–18,9%	9/44–20,5%	25/71–35,2%	
CD5	2	6/36–16,7%	1/31–3,2%	2/50–4,0%	18,352 0,001*
	1	15/36–41,7%	17/31–54,8%	10/50–20,0%	
	0	15/36–41,7%	13/31–41,9%	38/50–76,0%	
CD7	2	23/70–32,9%	8/52–15,4%	7/94–7,4%	22,750 0,000*
	1	21/70–30,0%	18/52–34,6%	24/94–25,5%	
	0	26/70–37,1%	26/52–50,0%	63/94–67,0%	
CD4	2	10/36–27,8%	6/31–19,4%	2/50–4,0%	12,480 0,014*
	1	11/36–30,6%	11/31–35,5%	13/50–26,0%	
	0	15/36–41,7%	14/31–45,2%	35/50–70,0%	
CD8	2	10/36–27,8%	5/31–16,1%	4/50–8,0%	12,079 0,017*
	1	11/36–30,6%	10/31–32,3%	13/50–26,0%	
	0	15/36–41,7%	16/31–51,6%	33/50–66,0%	
CD163	2	20/53–37,7%	3/24–12,5%	12/59–20,3%	11,669 0,020*
	1	15/53–28,3%	12/24–50,0%	15/59–25,4%	
	0	18/53–34,0%	9/24–37,5%	32/59–54,2%	
CD11b	2	1/16–6,3%	3/28–10,7%	1/36–2,8%	3,895 0,420
	1	7/16–43,8%	11/28–39,3%	10/36–27,8%	
	0	8/16–50,0%	14/28–50,0%	25/36–69,4%	
CD19	2	0%	1/19–5,3%	0%	5,808 0,364
	1	4/33–12,1%	5/19–26,3%	7/40–17,5%	
	0	29/33–87,9%	13/19–68,4%	33/40–82,5%	
CD37	2	5/33–15,2%	3/19–15,8%	2/40–5,0%	3,564 0,468
	1	5/33–15,2%	5/19–26,3%	8/40–20,0%	
	0	23/33–69,7%	11/19–57,9%	30/40–75,0%	
CD38	2	9/36–25,0%	6/31–19,4%	6/50–12,0%	4,326 0,364
	1	13/36–36,1%	9/31–29,0%	14/50–28,0%	
	0	14/36–38,9%	16/31–51,6%	30/50–60,0%	
*—достоверная взаимосвязь между признаками/reliable relationship between					

Таблица 8/Table 8

Субпопуляции иммунокомпетентных клеток в опухолях с различной экспрессией HLA-II/Subpopulations of immunocompetent cells in tumors with divers expression of HLA-II

CD	Степень реакции в баллах/ Grade of reaction in balls	Фенотип опухоли/Phenotype of tumor			χ^2 p
		HLA-II+	HLA-II±	HLA-II–	
CD45	2	14/19–73,7%	15/30–50,0%	54/136–39,7%	18,875 0,012*
	1	3/19–15,8%	12/30–40,0%	40/136–29,4%	
	0	2/19–10,5%	3/30–10,0%	42/136–30,9%	
CD5	2	1/10–10,0%	1/21–4,8%	8/102–7,8%	6,252 0,181
	1	6/10–60,0%	11/21–52,4%	32/102–31,4%	
	0	3/10–30,0%	9/21–42,9%	62/102–60,8%	
CD7	2	10/20–50,0%	5/38–13,2%	23/173–13,3%	23,643 0,000*
	1	6/20–30,0%	17/38–44,7%	49/173–28,3%	
	0	4/20–20,0%	16/38–42,1%	101/173–	
CD4	2	5/10–50,0%	4/21–19,0%	10/102–9,8%	12,979 0,011*
	1	2/10–20,0%	7/21–33,3%	30/102–29,4%	
	0	3/10–30,0%	10/21–47,6%	62/102–60,8%	
CD8	2	4/10–40,0%	4/21–19,0%	12/102–11,8%	10,714 0,030*
	1	4/10–40,0%	9/21–42,9%	28/102–27,5%	
	0	2/10–20,0%	8/21–38,1%	62/102–60,8%	
CD163	2	9/15–60,0%	5/24–20,8%	26/113–23,0%	10,785 0,029*
	1	2/15–13,3%	10/24–41,7%	36/113–31,9%	
	0	4/15–26,7%	9/24–37,5%	51/113–45,1%	
CD11b	2	0%	1/14–7,1%	4/61–6,6%	1,663 0,797
	1	3/5–60,0%	5/14–35,7%	20/61–32,8%	
	0	2/5–40,0%	8/14–57,1%	37/61–60,6%	
CD19	2	1/10–10,0%	0%	0%	11,756 0,019*
	1	3/10–30,0%	2/16–12,5%	13/82–15,9%	
	0	6/10–60,0%	14/16–87,5%	69/82–84,1%	
CD37	2	1/10–10,0%	4/16–25,0%	5/82–6,1%	10,136 0,038*
	1	4/10–40,0%	1/16–6,3%	14/82–17,1%	
	0	5/10–50,0%	11/16–68,7%	63/82–76,8%	
CD38	2	6/10–60,0%	5/21–23,8%	12/102–11,8%	21,332 0,000*
	1	3/10–30,0%	10/21–47,6%	30/102–29,4%	
	0	1/10–10,0%	6/21–28,6%	60/102–58,8%	
*–достоверная взаимосвязь между признаками /reliable relationship between					

CD29 (β-цепь VLA-интегринов)

Молекулы адгезии CD29 выявлялись на раковых клетках в 75,5% случаев. Мономорфная реакция в нашей серии исследований отмечена в 51,9% наблюдений, мозаичная – в 23,6%; 24,5% опухолей были антигеннегативными. Особенностью долькового рака была полная или частичная утрата этой детерминанты во всех случаях. Как уже было отмечено в предыдущих разделах, экспрессия CD29 достоверно положительно коррелировала с наличием молекул HLA. Каких-либо связей экспрессии β-цепи VLA с другими маркерами опухолевых клеток, а также уровнями лейкоцитарной инфильтрации, степенью распространенности процесса и прогнозом заболевания нами не выявлено.

Рецептор трансферрина CD71

Этот маркер обнаруживался на опухолевых клетках достаточно часто – в 75,6% случаев рака молочной железы. Мономорфная экспрессия отмечена в 53,7% наблюдений, мозаичная – в 21,9%. Только 24,4% опухолей были полностью антигеннегативными. CD71 не был достоверно взаимосвязан с другими изученными нами маркерами рака молочной железы, а также с уровнями инфильтрации опухоли иммунокомпетентными клетками и индексом Т.

При отсутствии CD71 на раковых клетках регионарные лимфоузлы достоверно чаще оставались интактными: индекс N_0 установлен в 70,0% случаев антигеннегативной группы, в 41,7% случаев мозаичной группы и в 42,0% случаев мономорфной группы (табл. 9).

Напротив, частота выявления метастазов в лимфоузлы с индексом N_1 возрастала по мере появления рецептора трансферрина на злокачественных клетках (25,0% в CD71⁻; 30,5% в CD71[±] и 37,5% в CD71⁺ группах). Частота выявления метастазов с индексом N_2 так же была значительно ниже в антигенотрицательных случаях по сравнению с антигенположительными (5,0%; 27,8% и 20,5% по группам соответственно, $\chi^2=12,127$; $p=0,016$).

В целом частота выявления метастазов в регионарные лимфоузлы была почти вдвое выше при наличии на опухолевых клетках CD71: метастазы в лимфоузлы обнаружены в 30,0% наблюдений антигеннегативной группы, в 58,3% наблюдений мозаичной группы и в 58,0% наблюдений мономорфной группы, взаимосвязь достоверна ($\chi^2=9,535$; $p=0,008$; $n=164$).

Можно также отметить, что, как и в случае с РЭА, мозаичные по экспрессии антигена опухоли не отличались от мономорфных по частоте обнаружения метастазов в регионарные лимфоузлы (58,3 и 58,0%). Очевидно, что при мозаичной реакции уже имеется клон клеток, обладающих, благодаря рецепторам трансферрина на клеточной мембране, определенными ростовыми преимуществами и по своим биологическим особенностям отличающихся от отрицательных фенотипов наличием более высокого метастатического потенциала.

CD29 (VLA β -chain)

Adhesion molecules CD29 were seen on tumor cells in 75.5% of cases. Homogeneous reaction was observed in 51.9%, mosaic in 23.6% and negative in 24.5% of tumors. Lobular carcinoma was characterized by complete or partial loss of this determinant in all cases.

As mentioned in the previous sections, CD29 expression demonstrated a significant positive correlation with HLA molecules. There were no relationships between VLA β -chain and other tumor cell markers, nor with leukocytic infiltration, disease advance or prognosis.

Transferrin receptor CD71

This marker was found on tumor cells rather frequently, i.e. in 75.6% of BC cases. Its expression was homogeneous in 53.7% and mosaic in 21.9% of cases. 24.4% of tumors were fully antigen-negative.

CD71 expression was not significantly related with other BC markers studied, tumor infiltration by immunocompetent cells or T-status.

The absence of regional metastases was significantly more frequent in CD71-negative cases: N₀ status was established in 70.0% of antigen-negative, 41.7% of mosaic and 42.0% of homogeneous expression groups (table 9).

On the contrary, the rate of N₁ cases increased with detection of the transferrin receptor on malignant cells (25.0% in CD71⁻, 30.5% in CD71[±] and 37.5% in CD71⁺ cases). The rate of N₂ status was also lower in antigen-negative as compared to antigen-positive cases (5.0%, 27.8% and 20.5% of the above-mentioned groups respectively, $\chi^2=12.127$; $p=0.016$).

As a whole, regional lymph node involvement was about two-fold more frequent in cases with CD71 expression on tumor cells: positive lymph nodes were detected in 30.0% of antigen-negative, 58.3% of mosaic and 58.0% of homogeneous expression cases, the differences being significant ($\chi^2=9.535$; $p=0.008$, $n=164$).

Of note, similarly to CEA there was no difference between groups with mosaic vs. homogeneous CD71 expression by frequency of regional lymph node involvement (58.3 vs. 58.0%). It seems that tumors with mosaic reaction already contain a cell clone with certain growth advantages and higher metastatic potential as compared to negative phenotypes owing to the presence of transferrin receptor.

Таблица 9/Table 9

Связь экспрессии CD71 с регионарным метастазированием/
Connection of CD71-expression with regional metastasing

Фенотип опухоли/ Phenotype of tumor	Индекс N/N Index (кол-во больных/n of patients –%)			Всего/Total
	N ₀	N ₁	N ₂	
CD71 +	37–42,0%	33–37,5%	18–20,5%	88–100,0%
CD71 ±	15–41,7%	11–30,5%	10–27,8%	36–100,0%
CD71 –	28–70,0%	10–25,0%	2–5,0%	40–100,0%
Всего/Total	80–48,8%	54–32,9%	30–18,3%	164–100,0%

$\chi^2=12,127$; $p=0,016$

Таблица 10/Table 10

Инфильтрация опухоли иммунокомпетентными клетками/
Infiltration of tumor immunocompetent cells

CD	Инфильтрация/Infiltration		
	Выраженная/ Significant	Умеренная/ Moderate	Слабая/ Weak
CD45	83/186–44,6%	55/186–29,6%	48/186–25,8%
CD5	10/134–7,5%	49/134–36,6%	75/134–55,9%
CD7	38/234–16,2%	72/234–30,8%	124/234–53,0%
CD4	19/134–14,2%	39/134–29,1%	76/134–56,7%
CD8	20/134–14,9%	41/134–30,6%	73/134–54,5%
CD163	40/153–26,1%	48/153–31,4%	65/153–42,5%
CD11b	5/81–6,2%	28/81–34,6%	48/81–59,2%
CD19	1/108–0,9%	18/108–16,7%	89/108–82,4%
CD37	10/108–9,3%	19/108–17,6%	79/108–73,1%
CD38	23/134–17,2%	43/134–32,1%	68/134–50,7%

Таблица 11

Связь CD45⁺ лейкоцитарной инфильтрации с регионарным метастазированием/
Communication of CD45⁺ leucocytic infiltration with regional metastasing

Метастазы в лимфоузлы/ Metastases in lymph nodes	Тип реакции/Type of reaction (кол-во больных/n of patients –%)			Всего/Total (кол-во/ n –%)
	Слабая/ Weak	Умеренная/ Moderate	Выраженная/ Significant	
Нет/Abscent	17 18,3%* 35,4%**	28 30,1%* 50,9%**	48 51,6%* 57,8%**	93 100,0%* 50,0%**
Есть/Present	31 33,3%* 64,6%**	27 29,0%* 49,1%**	35 37,6%* 42,2%**	93 100,0%* 50,0%**
Всего/Total	48 25,8%*	55 29,6%*	83 44,6%*	186 100,0%

$\chi^2=6,138$; $p=0,046$; *–процент в ряду/percent in rang; **–percent in column.

Таблица 12/Table 12

Взаимосвязь лейкоцитарной (CD45⁺) инфильтрации со стадией заболевания/
Relationship of CD45⁺ leucoinfiltration with stage of tumor

Стадия/ Stage	Уровень лейкоцитарной инфильтрации (CD45)/ Level of CD45 ⁺ leucoinfiltration			Всего/Total (кол-во/ n-%)
	Выраженная/ Significant	Умеренная/ Moderate	Слабая/Weak	
I	16–19,3%	10–18,2%	6–12,5%	32–17,2%
IIa	32–38,6%	16–29,1%	11–22,9%	59–31,7%
IIb	20–24,1%	9–16,4%	8–16,7%	37–19,9%
IIIa	5–6,0%	8–14,5%	7–14,6%	20–10,8%
IIIb	7–8,4%	5–9,1%	7–14,6%	10–5,4%
IV	3–3,6%	7–12,7%	9–18,8%	19–10,2%
Всего	83–100,0%	55–100,0%	48–100,0%	186
p=0,090; при объединении IIIa, IIIb и IV стадий в одну группу/with summing IIIa, IIIb and IV stages in one group $\chi^2=15,270$; p=0,029				

Таблица 13/Table 13

БРВ больных РМЖ в зависимости от уровня CD45⁺ лейкоцитарной инфильтрации опухоли/DFS of patients with BC in dependence of level CD45 leucoinfiltration of tumor

Инфильтрация CD45/CD45Infiltration (кол-во больных/ n of patients)	Безрецидивная выживаемость/Disease-free survival		
	5 лет/years %±m	10 лет/years %±m	средняя (мес.)/ averages (months) медиана (мес.)/ mediane (months)
Выраженная/ Significant (70)	69,1±5,8	60,6±7,6	110,76±8,03 не достигнута/ not achieved
Умеренная/ Moderate (40)	56,5±8,0	46,2±9,3	90,26±10,86 72 мес./month
Слабая/ Weak (32)	48,8±9,0	41,8±10,1	83,15±11,99 48 мес./month
p=0,0475			

Клиническое течение гетерогенных (мозаичных) по экспрессии CD71 опухолей определяется именно таким CD71–положительным клоном и соответствует клиническому течению опухолей, мономорфно экспрессирующих рецептор трансферрина.

Изучение связи экспрессии CD71 со стадией рака молочной железы показало, что I и IIa стадии заболевания чаще обнаруживались в антигеннегативной группе по сравнению с мозаичной и мономорфной: частота выявления I стадии составила по группам 22,5% (9/40); 8,3% (3/36) и 9,1% (8/88) соответственно, IIa стадии – 40,0% (16/40); 27,8% (10/36) и 34,1% (30/88) соответственно. Напротив, ни один случай IV стадии не относился к отрицательной группе, 3 из них мозаично и 9 – мономорфно экспрессировали CD71 ($p > 0,05$; $n = 164$).

При оценке отдаленных результатов лечения больных РМЖ оказалось, что отсутствие рецептора трансферрина на раковых клетках достоверно коррелировало с более высокой общей и безрецидивной выживаемостью. Напротив, экспрессия CD71, независимо от типа реакции (мономорфная или мозаичная), приводила к достоверному ухудшению показателей ОБ и БРВ. Кривые БРВ представлены на рис. 1.

Безрецидивная выживаемость была достоверно выше в антигеннегативной группе по сравнению с мозаичной и мономорфной группами ($n = 117$, $p = 0,0063$ по Лог-Ранк, $p = 0,0238$ по Бреслоу и $p = 0,0125$ по Тарон-Уорре тестам). Показатель 5-летней БРВ составил по группам соответственно $93,1 \pm 4,7\%$ ($n = 30$), $40,3 \pm 11,2\%$ ($n = 26$) и $63,5 \pm 7,0\%$ ($n = 61$). Средняя длительность безрецидивного периода составила при отсутствии антигена $123,53 \pm 5,78$ мес. (макс. – 132+ мес.), при мозаичной реакции – $46,44 \pm 4,45$ мес. (макс. 68+ мес) и при мономорфной реакции – $64,09 \pm 3,76$ мес. (макс. 84+ мес.). Медиана БРВ в первой и третьей группах не достигнута, во второй (с мозаичной реакцией) составила 48,00 мес. Общая выживаемость была также достоверно выше при отсутствии CD71 на клеточной мембране по сравнению с его наличием ($p = 0,0429$). Показатель 5-летней ОБ в антигеннегативной, мозаичной и мономорфной группах составил соответственно $96,4 \pm 3,5\%$, $63,9 \pm 10,4\%$ и $69,1 \pm 7,5\%$. Средние сроки наблюдения за больными составили при отсутствии антигена $127,93 \pm 4,0$ мес. (макс. – 132+ мес.), при мозаичной реакции – $58,56 \pm 2,63$ мес. (макс. 68+ мес) и при мономорфной реакции – $95,16 \pm 8,96$ мес. (макс. 130+ мес.). Медиана ОБ установлена только для 2 группы (66,0 мес.), а в первой и в третьей не достигнута. Особенно важно, что выявленные нами различия в выживаемости наблюдались не зависимо от метастатического поражения регионарных лимфоузлов. И у больных с интактными лимфоузлами (N_0), и у пациенток с метастазами в регионарные лимфоузлы (N^+) отсутствие CD71 оказалось фактором благоприятного прогноза и достоверно коррелировало с улучшением показателей ОБ и БРВ (учитывая близость кривых выживаемости для мономорфной и мозаичной реакции они объединены в одну антигенположительную группу).

Clinical course of tumors with heterogeneous (mosaic) expression is determined by this CD71-positive clone and is similar to the course of tumors with homogeneous transferrin receptor expression.

Analysis of relationship between CD71 expression and BC stage demonstrated that stages I and IIa were found more frequently in antigen-negative group as compared to cases with mosaic and homogeneous expression: respective rates were 22.5% (9/40), 8.3% (3/36) and 9.1% (8/88) for stage I and 40.0% (16/40), 27.8% (10/36) and 34.1% (30/88) for stage IIa disease. None of stage IV cases belonged to antigen-negative group with 3 demonstrating mosaic and 9 presenting with homogeneous CD71 expression ($p > 0.05$, $n=164$).

Analysis of follow-up results demonstrated that the absence of transferrin receptor on BC cells was significantly associated with increased OS and DFS. On the contrary, CD71 expression of both (mosaic or homogeneous) types was associated with significantly worse OS and DFS. Fig. 1 demonstrates DFS curves.

DFS was significantly higher in antigen-negative group as compared to cases with mosaic or homogeneous expression ($n=117$, $p=0.0063$ by long-rank test, $p=0.0238$ by Breslow test and $p=0.0125$ by Taron-Ware tests). The respective 5-year DFS rates were $93.1 \pm 4.7\%$ ($n=30$), $40.3 \pm 11.2\%$ ($n=26$), $63.5 \pm 7.0\%$ ($n=61$). Mean time to recurrence was 123.53 ± 5.78 months (max 132+ months) for antigen-negative group, 46.44 ± 4.45 months (max 68+ months) for cases with mosaic and 64.09 ± 3.76 months (max 84+ months) with homogeneous reactions. Median DFS was not achieved in groups 1 and 3, and was 48.00 months in group 2 (mosaic expression). OS was also higher in the absence than in the presence of CD71 on cell membrane ($p=0.0429$). The respective 5-year OS rates in antigen-negative, mosaic and homogeneous expression groups were $96.4 \pm 3.5\%$, $63.9 \pm 10.4\%$ and $69.1 \pm 7.5\%$. Mean follow-up terms were 127.93 ± 4.0 months (max 132+ months) in antigen-negative, 58.56 ± 2.63 months (max 68+ months) in mosaic and 95.16 ± 8.96 months (max 130+ months) in homogeneous expression groups. Median OS was achieved in group 2 only (66.0 months). Of most importance is that these differences in survival were not associated with regional lymph node involvement. The absence of CD71 was a good prognostic factor and significantly correlated with improved OS and DFS (since the curves for homogeneous and mosaic expressions were similar we united them into a single antigen-positive group) in patients both with (N^+) and without (N_0) metastases to regional lymph nodes.

В группу без метастазов в лимфоузлы (N_0) включено 64 больных. При отсутствии CD71 на опухолевых клетках БРВ достигала 100% ($n=22$) и была достоверно выше, чем в CD71–позитивной группе, где показатель 5-летней БРВ был равен $72,2 \pm 7,7\%$ ($n=42$), рис. 2 ($p=0,0358$). Столь выраженная связь экспрессии CD71 с результатами лечения рака молочной железы на ранних (N_0) стадиях ставит трансферриновый рецептор в разряд наиболее значимых факторов прогноза. Особенно важно подчеркнуть, что ни один из известных на сегодняшний день прогностических факторов не обладает столь высокой информативностью в группе больных РМЖ, не имеющих метастатического поражения лимфатических узлов. Следовательно, наши данные, полученные на сравнительно небольшой группе больных (64 наблюдения), могут послужить серьезным основанием для расширения исследований в этой области.

Такая же зависимость отмечена и для больных с метастазами в регионарные лимфоузлы (в эту группу включено 53 пациентки). Кривые выживаемости представлены на рис. 3. Безрецидивная выживаемость была достоверно выше при отсутствии CD71 на клеточной мембране по сравнению с CD71⁺ ($p=0,0488$). В первой группе показатель 5-летней БРВ составил $75,0 \pm 13,1\%$ ($n=8$), во второй – $36,4 \pm 10,0\%$ ($n=45$).

Аналогичные данные получены и при изучении общей выживаемости. И у больных без метастазов (N_0), и у больных с метастазами (N^+) общая выживаемость была достоверно выше при отсутствии CD71 на клеточной мембране по сравнению с его наличием ($p=0,0435$). Показатель 5-летней ОБ составил в группе N_0 : 100,0% при отсутствии CD71 и $74,9 \pm 8,2\%$ при наличии CD71; в группе N^+ : $85,8 \pm 13,2\%$ при отсутствии CD71 и $59,3 \pm 9,0\%$ при наличии CD71.

Обобщая данные по экспрессии CD71, важно отметить следующее. Рецептор имеет четкую взаимосвязь со степенью распространенности рака молочной железы: в CD71–негативных случаях метастазы в регионарные лимфоузлы наблюдаются значительно реже (индекс N_0 установлен у 70% пациенток с таким фенотипом). Вместе с тем, прогностическую роль рецептора нельзя объяснить ассоциацией с метастатическим поражением регионарных лимфоузлов. По-видимому, CD71 является независимым фактором, так как он сохраняет свое значение у всех групп больных вне зависимости от наличия или отсутствия метастазов.

II. Местные иммунные реакции при РМЖ

При изучении субпопуляций иммунокомпетентных клеток в гистологических срезах опухолей мы оценили общий уровень иммунной реакции по общелейкоцитарному антигену CD45, участие Т–лимфоцитов (CD5⁺ и CD7⁺) и их субпопуляций (CD4⁺ и CD8⁺), В–лимфоцитов (CD19⁺ и CD37⁺), CD38⁺–лимфоцитов и плазматических клеток и клеток миеломакрофагального ряда (CD163⁺ и CD11b⁺). Результаты представлены в табл. 10.

64 patients were node-negative. In cases without CD71 on tumor cells the DFS reached 100% (n=22) and was significantly higher than in CD71-positive group in which the 5-year DFS was $72.2 \pm 7.7\%$ (n=42), fig. 2 ($p=0.0358$). This very strong relationship between CD71 expression and treatment outcomes in early (N_0) BC makes transferrin receptor a most valuable factor of prognosis. It should be emphasized that none of prognostic factors known by today possess such a high informative value for node-negative BC patients. Therefore, our findings in a relatively small patient group (64 cases) may be a serious argument to continue this study in a more representative population.

There was a similar relationship in 53 patients with positive regional lymph nodes. Fig. 3 demonstrates the survival curves. DFS was significantly higher in the absence of CD71 on cell membrane as compared to CD71⁺ cases ($p=0.0488$). The 5-year DFS was $75.0 \pm 13.1\%$ in the former (n=8) and $36.4 \pm 10.0\%$ in the latter group (n=45).

Similar results were obtained by analysis of OS. The OS was significantly higher in CD71-negative than in CD71-positive cases ($p=0.0435$), for both N^+ and N_0 patients. The 5-year OS was 100.0% for CD71-negative vs. $74.9 \pm 8.2\%$ for CD71-positive subgroups of N_0 cases and $85.8 \pm 13.2\%$ for CD71-negative vs. $59.3 \pm 9.0\%$ for CD71-positive subgroups of N^+ patients.

Summarizing our findings on CD71 expression we should like to emphasize the following. The receptor demonstrated a clear-cut relation to BC advance, with significantly lower rates of regional lymph node involvement among CD71-negative patients (70% of patients with CD71-negative phenotype were node-negative). However, the prognostic value of transferrin receptor cannot be explained by association with metastatic affection of regional lymph nodes. CD71 seems to be an independent factor because it preserved its significance in all patient groups irrespective of the presence or absence of metastases.

Local immune reactions in breast cancer

Study of immunocompetent cell subpopulations in histologic tumor sections involved evaluation of total immune reaction level (all-leukocyte antigen CD45), contribution of T-lymphocytes (CD5⁺ and CD7⁺) and their subpopulations (CD4⁺ and CD8⁺), B-lymphocytes (CD19⁺ and CD37⁺), CD38⁺ lymphocytes and plasmic cells and myelomacrophages (CD163⁺ and CD11b⁺). Table 10 demonstrates results of this study.

Таблица 14/Table 14
БРВ больных РМЖ в зависимости от уровня CD8⁺ Т-инфильтрации опухоли/
DFS of patients with BC in dependence of level CD8⁺ T-cells infiltration of tumor

Тип реакции/ Type of reaction (кол-во больных/ n of patients)	Безрецидивная выживаемость/Disease-free survival		
	5 лет/ years %±m	10 лет/ years %±m	Средняя (мес.)/ averages (months) медиана (мес.)/ mediane (months)
Выраженная/ Significant (17)	81,5±9,7	65,8±12,7	119,11±13,92 не достигнута/ not achieved
Умеренная/ Moderate (31)	62,0±9,2	56,8±9,8	103,21±11,81 не достигнута/ not achieved
Слабая/Weak (50)	46,4±7,2	38,8±7,8	76,87±9,76 42 мес./month
p=0,0393			

Таблица 15/Table 15
БРВ больных РМЖ без метастазов в регионарные лимфоузлы в зависимости
от уровня CD8⁺ инфильтрации опухоли/DFS of patients with BC out metastases
in lymph nodes in dependence of level CD8⁺ infiltration of tumor

Тип реакции/ Type of reaction (кол-во больных/ n of patients)	Безрецидивная выживаемость/Disease-free survival		
	5 лет/ years %±m	10 лет/ years %±m	средняя (мес.)/ averages (months) медиана (мес.)/ mediane (months)
Выраженная/Significant/ Умеренная/Moderate (34)	83,9±6,6	75,2±8,3	129±8,84 мес./month не достигнута/ not achieved
Слабая/Weak (19)	62,7±11,2	40,3±15,0	90,85±15,22 мес./month 84 мес./month
p=0,0250 (Лог-Ранк/Log-Rank); p=0,0320 (Бреслоу/Breslow); p=0,0278 (Тарон-Уор/Тарон-Wore)			

Таблица 16/Table 16
ОВ больных РМЖ без метастазов в регионарные лимфоузлы в зависимости
от уровня CD8⁺ инфильтрации опухоли/OS of patients with BC out metastases
in regional lymph nodes in correlation with level of CD8⁺ infiltration of tumor

Тип реакции/ Type of reaction (кол-во больных/ n of patients)	Общая выживаемость/Overall survival		
	5 лет/years %±m	10 лет/years %±m	средняя (мес.)/averages(months) медиана (мес.)/mediane(months)
Выраженная/ Significant/ Умеренная/ Moderate (36)	94,4±3,8	89,2±6,3	136,48±6,78 мес./month не достигнута/not achieved
Слабая/Weak (19)	77,4±10,0	22,9±19,1	97,32±13,43 мес./month 96 мес./month
p=0,0105 (Лог-Ранк/Log-Rank); p=0,0252 (Бреслоу/Breslow); p=0,0125 (Тарон-Уор/Тарон-Wore)			

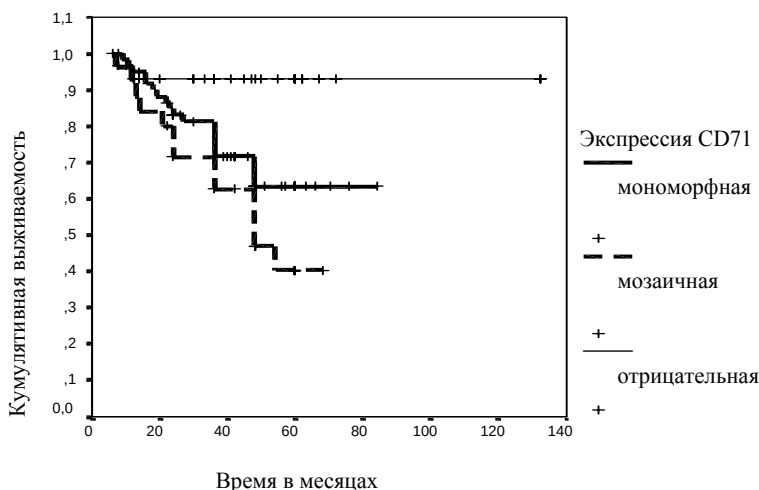


Рис. 1/ Fig. 1. БРВ больных РМЖ в зависимости от экспрессии CD71 на опухолевых клетках/DFS of patients with BC in dependence of CD71 expression in cancer cells: CD71 expression monomorphe; mozaic negative.

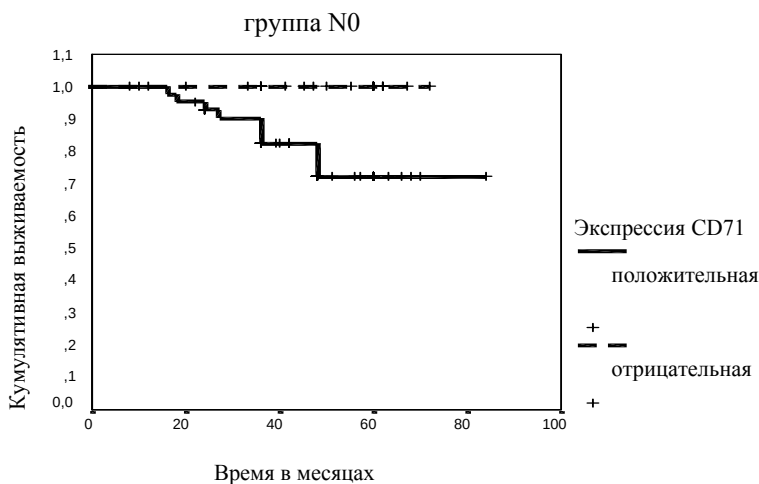


Рис. 2./ Fig. 2. БРВ больных РМЖ без метастазов в регионарные лимфоузлы в зависимости от экспрессии CD71 на опухолевых клетках: сравнение CD71⁺ и CD71⁻/ DFS of patients with BC grade N₀ in dependence of CD71 expression in cancer cells: comparison of CD71⁺ and CD71⁻.

Таблица 17/Table 17

БРВ РМЖ с метастазами в регионарные лимфоузлы в зависимости от уровня CD8⁺ инфильтрации опухоли/DFS of patients with BC metastases in lymph nodes in dependence of level CD8⁺ infiltration of tumor

Тип реакции/ Type of reaction (кол-во больных/ n of patients)	Безрецидивная выживаемость/Disease-free survival		
	5 лет/years %±m	10 лет/years %±m	средняя (мес.)/ averages (months) медиана (мес.)/ mediane (months)
Выраженная/ Significant/ Умеренная/ Moderate (14)	31,3±13,6	—	40,71±7,82 мес./month 24 мес./month
Слабая/Weak (31)	36,4±8,8	36,4±8,8	67,03±12,40 мес./month 24 мес./month
p=0,2440 (Лог-Ранк/Log-Rank); p=0,0872 (Бреслоу/Breslow); p=0,1319 (Тарон-Уор/Тарон-Уор)			

Таблица 18/Table 18

ОВ больных РМЖ с метастазами в регионарные лимфоузлы в зависимости от уровня CD8⁺ инфильтрации опухоли/OS of patients with BC metastases in lymph nodes in infiltration of level CD8⁺ infiltration of tumor

Тип реакции/ Type of reaction (кол-во больных/ n of patients)	Общая выживаемость/Overall survival		
	5 лет/years %±m	10 лет/years %±m	средняя (мес.)/ averages (months) медиана (мес.)/ mediane (months)
Выражен- ная/Significant/ Умерен- ная/Moderate (17)	68,6±11,7	—	74,34±10,92 мес./month 42 мес./month
Слабая/Weak (31)	44,7±9,4	34,7±9,6	78,03±11,37 мес./month 40 мес./month
p=0,0696 (Лог-Ранк/Log-Rank); p=0,0540 (Бреслоу/Breslow); p=0,0470 (Тарон-Уор/Тарон-Уор)			

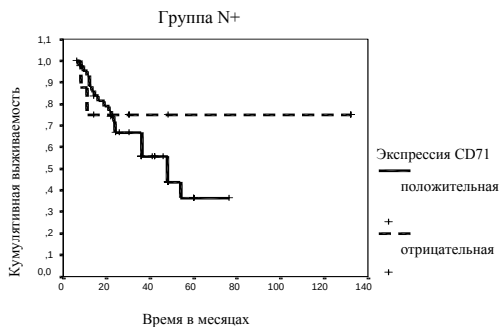


Рис. 3./Fig 3. БРВ больных РМЖ с метастазами в регионарные лимфатические узлы в зависимости от экспрессии CD71 на опухолевых клетках; сравнение CD71-положительной и CD71-негативной групп/DFS of patients with BC grade N⁺ in dependence of CD71 expression in cancer cells: CD71 expression: positive negative.

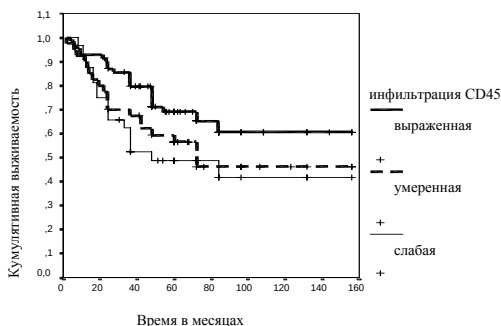


Рис. 4./Fig. 4. БРВ больных РМЖ в зависимости от уровня CD45⁺ лейкоцитарной инфильтрации опухоли/DFS of patients with BC in dependence of CD45⁺ infiltration of tumor cells.

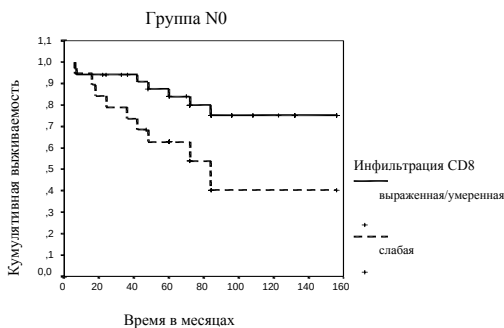


Рис. 5./Fig 5. БРВ больных РМЖ без метастазов в регионарные лимфатические узлы в зависимости от уровня CD8⁺ инфильтрации опухоли: сравнение групп с выраженной/умеренной (положительной) и слабой (отрицательной) реакцией/DFS of patients with BC in dependence of CD8⁺ infiltration of tumor cells: comparison of groups.

Общий уровень инфильтрации опухоли CD45⁺ клетками

Выраженный общий уровень местной иммунной реакции, оцененный по CD45, отмечался в 44,6% случаев, умеренный и слабый – реже (29,6% и 25,8% соответственно). Как мы уже отмечали ранее, общий уровень лейкоцитарной инфильтрации в значительной мере определялся экспрессией злокачественными клетками антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II классов.

Частота обнаружения метастазов в регионарные лимфоузлы увеличивалась со снижением общего уровня местных иммунных реакций (42,2%; 49,1% и 64,6% при выраженной, умеренной и слабой реакциях соответственно, взаимосвязь между признаками статистически достоверна, $\chi^2=6,138$; $p=0,046$; $n=186$; табл. 11). В тестах направленных оценок установлено, что зависимой переменной являются метастазы в лимфоузлы.

Аналогичная зависимость отмечена и для отдаленных метастазов. Частота их выявления увеличивалась по мере снижения общего уровня инфильтрации опухоли (3,6%; 12,7% и 18,8% при выраженной, умеренной и слабой реакциях соответственно, выявленная взаимосвязь между признаками статистически достоверна, $p=0,017$; $n=186$).

В целом по мере нарастания интенсивности общего уровня местного иммунного ответа по CD45 увеличивалась и доля более ранних стадий РМЖ и, соответственно, уменьшалась доля более поздних стадий (табл. 12).

С увеличением CD45⁺ инфильтрации опухоли улучшались и показатели общей и безрецидивной выживаемости больных раком молочной железы (различия по БРВ достоверны). Безрецидивная выживаемость была достоверно выше при выраженной CD45⁺ инфильтрации опухоли по сравнению с умеренной и слабой (табл. 13; рис. 4).

Аналогичная тенденция отмечена и для общей выживаемости. Показатель 5-летней ОВ при слабой, умеренной и выраженной CD45⁺ инфильтрации опухоли составил $61,4 \pm 9,3\%$; $72,7 \pm 7,0\%$ и $77,9 \pm 5,3\%$; показатель 10-летней ОВ – $35,7 \pm 11,7\%$; $54,7 \pm 10,8\%$ и $67,0 \pm 8,9\%$ ($p > 0,05$).

При разделении больных на группы в зависимости от состояния регионарных лимфоузлов оказалось, что различия в безрецидивной выживаемости выявлялись только у пациенток без метастазов (N_0). В этой группе показатель 5-летней и 10-летней БРВ был выше при выраженной инфильтрации CD45⁺-иммунокомпетентными клетками ($83,0 \pm 5,9\%$ и $76,1 \pm 8,5\%$ соответственно, $n=45$) по сравнению с умеренной/слабой инфильтрацией ($69,0 \pm 7,5\%$ и $51,9 \pm 10,3\%$ соответственно, $n=40$), различия близки к достоверным, $p=0,0563$. У больных с метастазами (N^+) различия в БРВ отсутствовали.

Таким образом, снижение уровней инфильтрации опухоли CD45⁺-иммунокомпетентными клетками ассоциируется с метастатическим поражением регионарных лимфоузлов и ухудшением выживаемости больных РМЖ.

Total tumor infiltration by CD45⁺ cells

High total level of local immune reaction as assessed by CD45 was detected in 44.6% of patients, while moderate and weak reactions were less common (29.6 and 25.8% respectively). As mentioned above, the total level of leukocytic infiltration was to a considerable extent determined by HLA-I and II antigens on cancer cells.

Rates of regional lymph node involvement increased with reduction in total level of local immune reactions (42.2%, 49.1% and 64.6% for intensive, moderate and weak reactions, respectively; the relationship was statistically significant: $\chi^2=6.138$, $p=0.046$, $n=186$; table 11). Lymph node metastasis was a dependent variable by directed estimate tests.

A similar relationship was seen for distant metastasis. Frequency of the marker detection was increasing as total tumor infiltration was reducing (3.6%, 12.7% and 18.8% for intensive, moderate and weak reactions, respectively; the relationship was statistically significant: $p=0.017$, $n=186$).

In the study population as a whole proportion of early BC was increasing and proportion of later stage BCs was reducing with increasing intensity of local immune response (CD45) (table 12).

Increased CD45⁺ infiltration of tumors was associated with improved OS and DFS (differences for DFS were statistically significant). DFS was significantly higher in cases with intensive CD45⁺ infiltration of tumors as compared to moderate and weak infiltration (table 13, fig. 4).

OS demonstrated a similar trend. The 5-year OS for weak, moderate and intensive CD45⁺ infiltration was $61.4\pm9.3\%$, $72.7\pm7.0\%$ and $77.9\pm5.3\%$; the respective 10-years survival rates were $35.7\pm11.7\%$, $54.7\pm10.8\%$ and $67.0\pm8.9\%$ ($p>0.05$).

Subgroup analysis with respect to regional lymph node involvement demonstrated that the differences in DFS were observed only in node-negative (N_0) patients. In this group the 5- and 10-year DFS rates were higher in cases with intensive ($83.0\pm5.9\%$ and $76.1\pm8.5\%$, respectively, $n=45$) than with moderate/weak (69.0 ± 7.5 and 51.9 ± 10.3 , respectively, $n=40$) CD45⁺ infiltration, the differences being close to significant: $p=0.0563$. Patients with positive nodes (N^+) presented with no differences in DFS.

Therefore, decrease in tumor infiltration by CD45⁺ immunocompetent cells was associated with regional lymph node involvement and decrease in survival of BC patients.

Реализация механизма противоопухолевой защиты, обусловленная лимфоидной (CD45⁺) инфильтрацией, в этом контексте становится более понятна, если принять во внимание установленную нами достоверную зависимость инфильтрации от экспрессии на раковых клетках молекул HLA-I и HLA-DR.

Т-лимфоциты (CD5⁺, CD7⁺) и их субпопуляции (CD4⁺ и CD8⁺)

Выраженная и умеренная инфильтрация рака молочной железы Т-лимфоцитами, оцененная по маркерам CD5 и CD7, отмечалась нами достаточно редко (для CD5 – 7,5% и 36,6% случаев; для CD7 – 16,2% и 30,8% случаев). Преобладала слабая Т-клеточная инфильтрация (для CD5 – 55,9% случаев, для CD7 – 53,0% случаев).

Эта же тенденция отмечена для субпопуляций Т-лимфоцитов. Выраженная, умеренная и слабая реакции CD4⁺-клеток отмечены в 14,2; 29,1 и 56,7% случаев соответственно, CD8⁺-клеток – в 14,9; 30,6 и 54,5% случаев соответственно.

Как мы уже отмечали ранее, инфильтрация опухоли Т-лимфоцитами была взаимосвязана с иммунофенотипом злокачественных клеток. Экспрессия РЭА сопровождалась достоверным снижением уровня обще-Т-клеточного ответа (CD7⁺); экспрессия HLA I и II классов, напротив, коррелировала с увеличением инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами и их субпопуляциями.

При изучении взаимосвязей между различными иммунокомпетентными клетками оказалось, что уровни Т-лимфоцитов (CD5, CD7) и их субпопуляций (CD4, CD8) высокодостоверно коррелировали между собой ($p < 0,001$), а также с реакцией В-лимфоцитов (CD19, CD37, $p < 0,05$), CD38⁺-плазмочитов ($p < 0,001$) и CD163⁺-макрофагов ($p < 0,05$). Общий уровень иммунной реакции, оцененный по CD45, также высокодостоверно коррелировал с инфильтрацией опухоли Т-лимфоцитами и их субпопуляциями ($p < 0,001$) и оказался зависимым от последних. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что в локальной иммунной реакции при раке молочной железы участвуют различные субпопуляции иммунокомпетентных клеток, тесно взаимосвязанных между собой. Результаты проведенного исследования согласуются со сложившимся мнением о ведущей роли Т-лимфоцитов в осуществлении противоопухолевой иммунной защиты.

Инфильтрация опухоли Т-лимфоцитами взаимосвязана со степенью распространенности и прогнозом. Так, уровни CD7⁺-Т-лимфоцитов и их субпопуляций (CD4⁺ и CD8⁺) достоверно отрицательно коррелировали с размером опухоли (для CD7 $p = 0,047$; $n = 234$; для CD4 $p = 0,026$; $n = 186$; для CD8 $p = 0,008$; $n = 186$). С уменьшением инфильтрации опухоли CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетками достоверно увеличивается частота обнаружения метастазов в регионарных лимфоузлах: с 21,1 до 67,1% для субпопуляции CD4⁺, $p = 0,001$, и с 25 до 67,1% для субпопуляции CD8⁺, $p = 0,002$.

Action of the antitumor defense mechanism involving lymphoid (CD45⁺) infiltration is more clear in this context in light of the established significant relationship between the infiltration and HLA-I and II expression on cancer cells.

T-lymphocytes (CD5⁺, CD7⁺) and their subpopulations (CD4⁺, CD8⁺)

Intensive and moderate infiltration of BC by T-lymphocytes assessed by CD5 and CD7 was not common (CD5 7.5 and 36.6; CD7 16.2 and 30.8%), while weak T-cell infiltration was prevalent (CD5 55.9, CD7 53.0%).

A similar trend was seen for T-lymphocyte subpopulations. Intensive, moderate and weak reactions of CD4⁺ cells were seen in 14.2, 29.1 and 56.7% of cases respectively, the respective rates for CD8⁺ cells were 14.9, 30.6 and 54.4%.

As mentioned above, T-lymphocytic infiltration of tumors was related with cancer cell immunophenotype. CEA expression was associated with significant reduction in total T-cell response (CD7⁺); while HLA-I and II expression correlated with increased tumor infiltration by T-lymphocytes and their subpopulations.

Analysis of relationship between different immunocompetent cells demonstrated that levels of T-lymphocytes (CD5, CD7) and their subpopulations (CD4, CD8) correlated with high significance ($p < 0.001$) and related with reaction of B-lymphocytes (CD19, CD37; $p < 0.05$), CD38⁺ plasmacytes ($p < 0.001$) and CD163⁺ macrophages ($p < 0.05$). Total level of immune reaction (CD45) correlated with high significance with tumor infiltration by T-lymphocytes and their subpopulations ($p < 0.001$) and depended on the latter. Therefore, different closely interrelated subpopulations of immunocompetent cells were involved in local immune reaction in BC. Our findings agreed with the notion of T-lymphocytes playing the key role in antitumor immune defense mechanisms.

Tumor infiltration by T-lymphocytes was related with disease advance and prognosis. For instance, levels of CD7⁺ T-lymphocytes and their subpopulations (CD4⁺ and CD8⁺) demonstrated significant negative relationship with tumor size ($p = 0.047$ for CD7, $n = 234$; $p = 0.026$ for CD4, $n = 186$; $p = 0.008$ for CD8, $n = 186$). Decreased tumor infiltration by CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes was associated with increase in regional lymph node metastasis from 21.1% to 67.1% for CD4⁺ subpopulation ($p = 0.001$) and from 25 to 67.1% for CD8⁺ subpopulation ($p = 0.002$).

Стадия заболевания была достоверно отрицательно взаимосвязана с инфильтрацией опухоли $CD8^+$ -лимфоцитами ($p=0,037$; $n=134$).

Благоприятная прогностическая роль более выраженной инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами и их субпопуляциями подтвердилась при изучении общей и безрецидивной выживаемости больных после выполнения радикальной операции. Отмечена тенденция к увеличению показателей ОБ и БРВ с увеличением реакции $CD7^+$ Т-клеток и $CD4^+$ хелперов/индукторов, однако связь между признаками не была достоверной.

В отличие от них, уровни интратуморальных $CD8^+$ Т-лимфоцитов были достоверно связаны с отдаленными результатами лечения.

С увеличением степени выраженности $CD8^+$ -инфильтрации опухоли отмечено достоверное улучшение показателей безрецидивной выживаемости больных раком молочной железы (табл. 14).

Общая выживаемость больных раком молочной железы также достоверно увеличивалась с увеличением инфильтрации опухоли $CD8^+$ -лимфоцитами ($p=0,0208$). Показатели 5-летней и 10-летней ОБ составили в группе с выраженной инфильтрацией $88,9 \pm 7,4$ и $71,1 \pm 17,0\%$ соответственно, в группе с умеренной инфильтрацией – $85,1 \pm 6,7$ и $69,8 \pm 9,7\%$ соответственно и были достоверно выше, чем в группе со слабой инфильтрацией ($57,2 \pm 7,3$ и $35,3 \pm 9,7\%$ соответственно).

Изучение кривых выживаемости показало их близость для случаев с выраженной и умеренной реакцией $CD8^+$ иммунокомпетентных клеток. Мы объединили их в одну положительную группу и сравнили со слабой реакцией (отрицательная группа). Оказалось, что БРВ при выраженной или умеренной $CD8^+$ -инфильтрации ($n=48$) была достоверно выше, чем при слабой ($n=50$), $p=0,0196$. 5-летняя БРВ составила $69,0 \pm 7,0$ и $46,4 \pm 7,2\%$ соответственно, 10-летняя БРВ – $59,5 \pm 7,9$ и $38,8 \pm 7,8\%$ соответственно. Средняя длительность безрецидивного периода значительно выше в $CD8$ -положительной группе по сравнению с отрицательной, составляя $108,49 \pm 9,18$ мес. (макс. 156+ мес.) и $76,87 \pm 9,76$ мес. (макс. 156+ мес.) соответственно. Медиана БРВ установлена только для второй группы (42 мес.), а в первой не достигнута.

Аналогичная взаимосвязь отмечена и для ОБ, которая была достоверно выше в $CD8$ -положительной группе по сравнению с $CD8$ -отрицательной ($p=0,0074$). Показатели 5-летней ОБ составили $86,4 \pm 4,8$ и $57,2 \pm 7,3\%$ соответственно, 10-летней ОБ – $71,5 \pm 8,1$ и $35,3 \pm 9,7\%$ соответственно. Средние сроки наблюдения за больными составили $120,94 \pm 7,46$ мес. (макс. 156+ мес.) и $88,22 \pm 9,02$ мес. (макс. 156+ мес.) соответственно. Медиана ОБ установлена только для 2 группы (72,0 мес.), а в 1 не достигнута.

Для того чтобы выяснить, является ли уровень $CD8^+$ -инфильтрации опухоли самостоятельным прогностическим фактором, или его влияние опосредуется через взаимосвязь с регионарным метастазированием, мы проанализировали выживаемость больных в зависимости от состояния регионарных лимфоузлов.

Disease stage showed a significant negative relationship with tumor infiltration by CD8⁺ lymphocytes ($p=0.037$, $n=134$).

The favorable role of more intensive tumor infiltration by T-lymphocytes and their subpopulations was confirmed by our findings from analysis of OS and DFS after curative surgery. The OS and DFS demonstrated an increasing trend with rise in reactivity of CD7⁺ T-cells and CD4⁺ helpers/inducers, though the relationship was not significant.

However, levels of intratumoral CD8⁺ T-lymphocytes were significantly related with follow-up outcomes.

Increase in degree of CD8⁺ infiltration of tumors was associated with significant improvement in DFS of BC patients (table 14).

OS in BC also improved significantly with increase in tumor infiltration by CD8⁺ lymphocytes ($p=0.0208$).

The 5- and 10-year OS rates were 88.9 ± 7.4 and $71.1\pm 17.0\%$, respectively, in cases with intensive infiltration and 85.1 ± 6.7 and $69.8\pm 9.7\%$, respectively, in patients with moderate infiltration, and were significantly higher than in the weak infiltration group ($57.2\pm 7.3\%$ and $35.3\pm 9.7\%$, respectively).

Survival curves were close for groups with intensive and moderate reaction of CD8⁺ immunocompetent cells, we therefore united them into a single group and compared with weak reaction cases (negative group). DFS in the intensive/moderate CD8⁺ infiltration group ($n=48$) appeared significantly higher than in the weak reaction one ($n=50$), $p=0.0196$. The 5-year DFS rates were 69.0 ± 7.0 vs. $46.4\pm 7.2\%$, respectively, and the 10-year DFS rates were 59.5 ± 7.9 vs. $38.8\pm 7.8\%$, respectively. Mean DFS time was significantly longer in the CD8-positive than in the CD8-negative group and reached 108.49 ± 9.18 months (max 156⁺ months) vs. 76.87 ± 9.76 months (max 156⁺ months), respectively. Median DFS was achieved in the latter group only (42 months).

A similar relationship was observed for OS that was significantly higher in CD8-positive than in CD8-negative population ($p=0.0074$). The 5-year OS rates were 86.4 ± 4.8 vs. $57.2\pm 7.3\%$, respectively, the 10-year OS rates were 71.5 ± 8.1 vs. $35.3\pm 9.7\%$, respectively. Mean follow-up time was 120.94 ± 7.46 months (max 156⁺ months) vs. 88.22 ± 9.02 months (max 156⁺ months), respectively. Median OS was achieved in the latter group only (72 months).

We analyzed patient survival with respect to regional lymph node status to find out whether tumor infiltration by CD8⁺ cells was an independent prognostic factor or its effect was mediated by local metastasis.

Оказалось, что различия в безрецидивной и общей выживаемости в зависимости от уровня $CD8^+$ -инфильтрации проявились только у пациенток, не имеющих метастазов в регионарные лимфатические узлы: у больных с индексом N_0 выживаемость была достоверно выше в группе с выраженной/умеренной реакцией по сравнению со слабой (табл. 15; 16; рис. 5).

У больных с метастазами в лимфоузлы различий в безрецидивной и общей выживаемости не отмечено (табл. 17; 18).

Таким образом, проведенные иммуногистохимические исследования интратуморальных Т-лимфоцитов и их субпопуляций показали, что наибольшую связь с клиническим течением и прогнозом заболевания имеют $CD8^+$ -клетки. Снижение их количества взаимосвязано с метастатическим поражением регионарных лимфоузлов, более характерно для поздних стадий заболевания и достоверного ухудшения выживаемости.

В-лимфоциты и макрофаги

Мы также изучили участие макрофагов и В-лимфоцитов в местной иммунной реакции при РМЖ.

Выраженная, умеренная и слабая инфильтрация опухоли $CD163^+$ -макрофагами встречалась в 26,1; 31,4 и 42,5% случаев соответственно.

Уровень макрофагальной инфильтрации высокодостоверно положительно коррелировал

1. с общим уровнем иммунокомпетентных клеток, оцененным по $CD45$ ($p < 0,001$),
2. с количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов ($p < 0,05$) и $CD8^+$ Т-лимфоцитов ($p < 0,05$), причем зависимой во всех случаях оказалась реакция макрофагов.

Аналогичная взаимосвязь отмечена и для $CD11b^+$ клеток. Связи макрофагальной ($CD163^+$) инфильтрации опухоли со степенью распространенности и прогнозом заболевания нами не установлено.

Наиболее редко в гистологических срезах РМЖ мы обнаруживали В-лимфоциты, которые были взаимосвязаны с инфильтрацией опухоли Т-клетками ($p < 0,01$) и с общим уровнем иммунного ответа ($p < 0,05$).

Каких-либо особенностей и достоверных отличий в клиническом течении опухолей в зависимости от уровня В-лимфоцитарной ($CD19^+$ и $CD37^+$) и плазмочитарной ($CD38^+$) инфильтрации нами не обнаружено.

Результаты исследований подтвердили важную роль иммунной системы в развитии и клиническом течении РМЖ и обусловленность локального иммунного ответа фенотипическими характеристиками злокачественных клеток.

It appeared that differences in DFS and OS with respect to CD8⁺ infiltration level were observed only in node-negative patients: survival of N₀ patients was significantly higher in the subgroup with intensive/moderate than with weak reaction (tables 15; 16; fig. 5).

Patients with regional lymph node metastasis demonstrated no differences in DFS or OS (table 17; 18).

Therefore, our immunohistochemical study of intratumoral T-lymphocytes and their subpopulations showed CD8⁺-cells to have the highest relationship with disease clinical course and prognosis. Decreased levels of these cells were associated with metastatic regional lymph node involvement, later disease stage and significantly poorer survival.

B-lymphocytes and macrophages

We also analyzed contribution of macrophages and B-lymphocytes to local immune reaction in patients with BC. Intensive, moderate and weak tumor infiltration by CD163⁺ macrophages was detected in 26.1; 31.4 and 42.5% of cases respectively. Magnitude of macrophage infiltration demonstrated a highly significant relationship

1. with total level of immunocompetent cells (CD45) ($p < 0.001$),
2. CD4⁺ ($p < 0.05$) and CD8⁺ T-lymphocyte ($p < 0.05$) levels, with macrophage reactivity being the dependant factor.

CD11b⁺ cells demonstrated a similar relationship. Tumor infiltration by macrophages (CD163⁺) was not related with disease advance or prognosis.

B-lymphocytes were least common in BC histological sections and were related with tumor infiltration by T-cells ($p < 0.01$) and total immune response ($p < 0.05$). We failed to find any peculiarities or significant differences in disease clinical course with respect to levels of B-lymphocytic (CD19⁺, CD37⁺) or plasmacytic (CD38⁺) infiltrations.

Our findings as a whole confirmed the important role of the immune system in BC development and clinical course, and dependence of local immune response on cancer cell phenotypic features.

Заключение

Проведенное исследование показало: иммунологические маркеры могут отражать биологические свойства опухолей и непосредственно влиять на прогноз – рецептор трансферрина и РЭА. Другим механизмом реализации прогностической роли иммунофенотипа является опосредованное действие через иммунную систему – молекулы HLA. Молекулы HLA-I и HLA-DR связаны со степенью выраженности и структурой местных иммунных реакций по большинству субпопуляций иммунокомпетентных клеток. В свою очередь, уровни инфильтрации опухоли иммунокомпетентными клетками, в особенности, CD8⁺-лимфоцитами, коррелируют со степенью распространенности и прогнозом РМЖ.

Conclusion

Our study has demonstrated that immunologic markers may reflect tumor biologic features and produce a direct impact on disease prognosis (transferrin receptor and CEA). Another mechanism of realization of immunophenotype prognostic role is indirect action via the immune system (HLA molecules). Molecules HLA-I and HLA-DR are related with intensity and pattern of local immune reactions with most immunocompetent cell subpopulations. In turn, levels of tumor infiltration by immunocompetent cells, in particular CD8⁺ lymphocytes are correlated with BC advance and prognosis.

Литература/References

1. Артамонова Е.В., Огнерубов Н.А., Тупицын Н.Н., Летягин В.П. Рак молочной железы: иммунологические факторы прогноза. Издательство Воронежского государственного университета, 2005. – 240 с.
2. Енгай Д.А., Поддубная И.В., Тупицын Н.Н. Опухоли женской репродуктивной системы, 2008.
3. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Молекулярные маркеры прогноза и лекарственной чувствительности рака молочной железы // Н.И. Переводчикова (ред.). Новое в терапии рака молочной железы. – М.: Рон-Пуленк Рорер. – С. 19–24.
4. Зборовская И.Б., Ельчева И.А., Татосян А.Г. «Молекулярно-генетические исследования рака молочной железы: онкогены и гены супрессоры». // Н.И.Переводчикова (ред.). Новое в терапии рака молочной железы. – М.: Рон-Пуленк Рорер. – 1998. – С. 11–8.
5. Носов Д.А. Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста. // Материалы V ежегодной Российской онкологической конференции 27–29 ноября 2001 г. – Москва – С. 48–50.
6. Субботина А.А. и соавт. Роль иммунофенотипирования рака молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии. В настоящем номере.
7. Тупицын Н.Н. Иммунофенотип рака молочной железы. В кн. Рак молочной железы/Под ред. Н.Е. Кушлинского, С.М. Портного, К.П. Лактионова. – М.: Издательство РАМН, 2005. – С. 174–97.
8. Di Leo A. et al. Molecular predictors of response to anthracyclines. // Proc ASCO 2008. - Ed. Book. – p. 3–7.
9. Dowsett M. Factors predicting response and resistance to endocrine therapy of breast cancer. // Proc ASCO 2008. – Ed. Book. – p. 14–7.
10. Valkamonic F., Grigolato G., Donato F. et al. Ki67: is it a prognostic index in node negative breast cancer patients? // EJC. – 2001. – Vol. 37, suppl. 6. – S 121, abstr. 441.
11. Veronesi U., Goldhirsch A., Yarnold J. Breast cancer. // Peckham M., Pinedo H., Veronesi U. (eds.). Oxford textbook of oncology. – Oxford: Oxford University Press. – 1995. – P. 1241–92.

А.А. Субботина¹, В.П. Летагин², Н.Н. Тупицын², В.Д. Ермилова², И.В. Высоцкая¹

**РОЛЬ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ**

¹Кафедра онкологии ММА им. И.М. Сеченова;

²НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Резюме

Проведено исследование иммунофенотипа опухолевых клеток и уровней интралимфоцитарных лимфоцитов до назначения неоадьювантной химиотерапии (материал кор-биопсии) и после ее окончания (операционный материал) у 31 больной первично неоперабельным раком молочной железы.

В работе продемонстрирована зависимость эффекта химиотерапии по схемам CAF и CMF-VP (регрессия опухоли) от иммунофенотипических особенностей рака молочной железы. Установлена высокая информативность экспрессии общей β -цепи интегринов CD29 (резистентность к химиотерапии) и рецептора апоптоза FAS/APO-1(CD95) на опухолевых клетках (чувствительность к химиотерапии).

Полихимиотерапия в режиме CAF селективно элиминирует CD95-позитивные клетки, что позволяет добиться большей степени выраженности патоморфоза для пациенток CD95-позитивной группы. Это свидетельствует о большей эффективности лечения антрациклин-содержащими комбинациями.

Определена достоверная взаимосвязь между уровнями инфильтрации ткани рака молочной железы субпопуляциями лимфоцитов до назначения неоадьювантной химиотерапии и степенью выраженности патоморфоза удаленной опухоли.

Выраженность патоморфоза и степень регрессии опухоли коррелировали с уровнями инфильтрации опухоли Т-клетками (CD7) и активированными клетками (CD25). Активированные лимфоциты играли роль в выраженности патоморфоза только в случаях лечения антрациклин-содержащими схемами.

Полученные в работе результаты дают основание рекомендовать исследование маркеров CD25, CD7, CD29, CD95 в ткани рака молочной железы с целью выделения групп больных, различающихся по чувствительности к химиотерапии, и назначения оптимальных схем лекарственного лечения с учетом данных иммунофенотипирования.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммунофенотип, чувствительность к химиотерапии.

A.A. Subbotina¹, V.P. Letyagin², N.N. Tupitsyn², V.D. Ermilova², I.V. Vysotskaya¹

THE ROLE OF BREAST CANCER

IMMUNOPHENOTYPING DURING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

¹Chair of Oncology, I.M. Sechenov MMA;

²Clinical Oncology Research Institute, N.N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow

Abstract

We studied tumor cell immunophenotype and measured intratumoral lymphocyte levels before (core-biopsies) and after (surgical specimens) neoadjuvant chemotherapy in 31 patients with vanced breast cancer.

The study demonstrated that response to CAF and CMF VP chemotherapies (tumor regression) was related to breast cancer immunophenotypic features. Of high informative value were expressions of integrin CD29 common β -chain (resistance to chemotherapy) and apoptosis receptor FAS/APO-1(CD95) (responsiveness to chemotherapy) on tumor cells.

Polychemotherapy by CAF schedule selectively eliminated CD95-positive cells and led to greater pathomorphoses in CD95-positive patients. Anthacyclinecontaining regimens were therefore more effective in this population.

A statistically significant relationship was established between breast cancer tissue infiltration by lymphocyte subpopulations before neoadjuvant chemotherapy and grade of pathomorphosis in dissected tumors.

Magnitudes of pathomorphosis and tumor regression correlated with infiltration of tumor tissues by T-cells (CD7) and activated cells (CD25). The activated lymphocytes were important as to pathomorphosis intensity only in patients receiving anthracycline-containing therapies.

We recommend to measure CD25, CD7, CD29, CD95 levels in breast cancer tissue to identify patient subpopulations with respect to sensitivity to chemotherapy and to prescribe optimal chemotherapy regimens basing on immunophenotyping findings.

Key words: breast cancer, immunophenotype, sensitivity to chemotherapy.

Введение

В структуре онкологической заболеваемости женщин РМЖ занимает первое место, его удельный вес составляет 19,8% [1]. Несмотря на определенные успехи в диагностике и лечении, темпы прироста заболеваемости РМЖ неуклонно растут, причем значительную долю составляют местно-распространенные формы заболевания [2].

Комплексная терапия данной категории пациенток является сложной задачей. Вот почему проблема прогнозирования исхода болезни и выбора адекватных схем индукционного лечения, является первостепенной в клинической практике [3].

Общеизвестно, что опухоли, имеющие одинаковую стадию по классификации TNM, зачастую радикально отличаются по агрессивности течения заболевания и чувствительности к проводимой терапии. Это объясняется индивидуальными биологическими особенностями злокачественных клеток [4].

За последние годы существенно расширились представления об особенностях биологии РМЖ, идентифицирован ряд характерных генетических изменений. Исследуются биологические показатели, которые могут иметь прогностическое значение. Изучаются возможные маркеры лекарственной чувствительности и резистентности. Они ведутся по двум основным направлениям: изучение иммунофенотипа опухоли и изучение противоопухолевого иммунитета [5; 6]. Иммунологические исследования в последние годы стали одним из приоритетов в структуре научных изысканий.

Высокая информативность и значимость иммунофенотипирования опухолей хорошо известна при гемобластазах. Построена схема иммунологической дифференцировки гемопоэтических клеток, и определено прогностическое значение проведения иммунофенотипирования.

Для солидных опухолей вообще и для РМЖ, в частности, система знаний об изменении иммунофенотипа эпителиальных клеток по мере их дифференцировки – предмет активного изучения.

Исследования в этом направлении стали широко применяться с внедрением в клиническую практику использования моноклональных антител как к лейкоцитарным молекулам, так и к антигенам и рецепторам специфичным для эпителиальных клеток [7–9].

Материалы и методы

Материалом послужили результаты 62 исследований опухолевого иммунофенотипа у 31 больной местно-распространенным РМЖ.

Возраст женщин от 27 до 72 лет, (в среднем 49,3). Из них у 14 больных (45,2%) менструальная функция была сохранена, 2 пациентки (6,4%) находились в состоянии перименопаузы и 15 больных – в постменопаузе (48,4%).

Introduction

Breast cancer is the commonest female malignancy accounting for 19.8% of cancer cases [1]. Notwithstanding the progress in the diagnosis and treatment, breast cancer incidence demonstrates a continuously rising trend with a large portion of patients presenting with locally advanced disease at diagnosis [2]. Multi-modality treatment in this patient category is problematic. Prognosis of disease outcome and choice of adequate induction regimens are therefore essential [3].

As known, tumors of the same TNM stage may differ considerably by aggressiveness and response to treatment due to individual biological features of malignant cells [4].

Over recent years knowledge of breast cancer biology has increased noticeably, with many characteristic genetic alterations being identified. Study of biological markers of potential prognostic value, such as drug sensitivity and resistance markers is in progress. Main fields of this study are immunophenotyping of tumors and analysis of antitumor immunity [5; 6]. Immunologic study has recently become of top priority among other areas of research.

High informative value and significance of tumor immunophenotyping are well known in hematology malignancies. There is a commonly accepted procedure for immunologic differentiation of hemopoietic cells, and prognostic value of immunophenotyping is established.

As to solid tumors in general and breast cancer in particular, clinical use of monoclonal antibodies to both leukocytic molecules and epithelial cell-specific antigens and receptors stimulated a vast study of changes in epithelial cell immunophenotype occurring with cell differentiation [7–9].

Materials and methods

We have studied tumor immunophenotype in 62 specimens from 31 patients with locally advanced breast cancer.

The patients' age was 27 to 72 (mean 49.3) years. Of these patients 14 (45.2%) had menstrual function preserved, 2 (6.4%) were perimenopausal and 15 (48.4%) were postmenopausal.

Стандартный объем предоперационного обследования у больных РМЖ включал маммографию обеих молочных желез в двух проекциях, ультразвуковое исследование подмышечных, надключичных и подключичных лимфатических узлов, органов малого таза и печени, рентгенографию органов грудной клетки, сканирование костей скелета. По данным предоперационного исследования отдаленных метастатических изменений у пациенток, включенных в исследование, выявлено не было.

У всех больных клинический диагноз РМЖ был подтвержден данными гистологического исследования опухоли, которое проводилось дважды – на материале кор-биопсии до неoadьювантной химиотерапии и на материале хирургически удаленной опухоли. Наибольшее количество наблюдений относилось к Шб стадии (70,9%), на 2 месте по частоте были больные со IIб стадией (16,1%), меньше всего было пациенток с IIIа стадией (13,0%) опухолевого процесса (табл. 1).

До проведения настоящей работы никакого специфического лечения больным не проводили.

При гистологическом исследовании получено, что наиболее часто встречался инфильтративный протоковый рак – 23 наблюдения (74,2%). Обращает на себя внимание достаточно высокая пропорция инфильтративного долькового рака – 7 случаев (22,6%). И лишь в 1 клиническом случае (3,2%) отмечена слизистая форма новообразования.

Результаты морфологического исследования представлены в табл. 2.

По типу неoadьювантной терапии больные были разделены на 2 группы:

- **первая** (16 пациенток): 2 курса полихимиотерапии по схеме CAF;
- **вторая** (15 пациенток): полихимиотерапия по схеме CMF–VP.

Через 2,5-3 нед. после окончания химиотерапии у всех пациенток по клиническим и рентгенологическим данным оценена степень регрессии опухоли. Полного эффекта, а также прогрессирования заболевания за время наблюдения отмечено не было.

У всех женщин наблюдался частичный эффект с различной степенью регрессии опухоли. У 71% больных зарегистрирован умеренно-выраженный эффект, в остальных случаях изменения трактовались как минимальный клинический эффект. Данные представлены в табл. 3.

Выраженность лечебного патоморфоза оценивали по гистологическим данным после оперативного этапа: в 14 клинических случаях (50,0%) – выявлены признаки II степени; в 10 (35,7%) I степень, только в 3 клинических случаях (10,7%) удалось достигнуть выраженной (III степени) лечебного патоморфоза (рис. 1).

Иммунологическое исследование проводилось на криостатных срезах 31 опухоли молочных желез, полученных в ходе оперативного вмешательства и трепанобиопсии.

Standard preoperative assessment included mammography of both breasts in two views; ultrasound scan of axillary, supra- and subclavicular lymph nodes, small pelvis and liver; chest x-ray; bone scan. Preoperative assessment discovered no metastatic disease in any of the patients.

All patients had their diagnosis of breast cancer confirmed histologically before neoadjuvant chemotherapy (core-biopsies) and after tumor dissection (surgical specimens). Most (70.9%) of the patients had stage IIIb, 16.1% had stage IIb and 13.0% had stage IIIa disease (table 1).

The patients received no specific treatment before the study.

Infiltrative ductal carcinoma was most common (23/74.2%) tumor histology. Of note is a rather high proportion of infiltrative lobular carcinoma discovered in 7 (22.6%) cases. Mucous tumor was found only in 1 case (3.2%). Table 2 demonstrates distribution of cases by tumor morphology.

The patients were divided into 2 groups with respect to neoadjuvant chemotherapy type:

- **group 1** (n=16) received 2 cycles of polychemotherapy by CAF schedule;
- **group 2** (n=15) received CMF VP polychemotherapy.

At 2.5 or 3 weeks after chemotherapy start all patients had clinical and x-ray assessment of tumor regression. None of the patients presented with complete response or disease progression. Partial responses were defined as moderate in 71% and as minimal in the remaining cases (table 3).

Intensity of therapeutic pathomorphosis was assessed by histological findings after surgical treatment: 14 cases (50.0%) presented with grade II, 10 (35.7%) had grade I and only 3 (10.7%) had marked (grade III) pathomorphosis (fig. 1).

Immunologic study was made on frozen sections of 31 surgical and 31 trephine biopsy specimens of breast tumors.

Результаты исследования и обсуждение

Во всех случаях был изучен иммунофенотип опухолевых клеток до и после проведения неoadъювантной химиотерапии как в целом по группе, так и в зависимости от примененной схемы (CAF и CMF-VP). Оценена экспрессия клетками опухоли панцитокератинов (в 100% случаев мономорфный положительная реакция), молекул интегринов (CD29), трансферринового рецептора (CD71), молекул HLA-I и II классов, CD95 (рецептор, опосредующий апоптоз), антигенов MUC-1 и CD 54 (ICAM-1, молекула межклеточной адгезии), а также показатели инфильтрации опухоли субпопуляциями лимфоцитов (рис. 2). Чаще всего экспрессировались антигены MUC 1, CD71, молекулы HLA I-класса и общей β -цепи интегринов CD29.

Нам представлялось интересным оценить, насколько иммунофенотип клеток РМЖ, взаимосвязан с эффективностью неoadъювантной химиотерапии. Мы использовали 2 критерия эффективности химиотерапии – регрессию опухоли, на основании клинико-рентгенологических данных и степень патоморфоза опухолевой ткани.

В нашем исследовании 2 этих признака были достоверно взаимосвязаны между собой. В целях большей наглядности и информативности анализа, мы сочли целесообразным использовать минимальное дробление на группы и объединили 0–I степени патоморфоза (как незначительную или минимальную) и II–III степени (отчетливый, умеренный патоморфоз).

Минимальный клинико-рентгенологический эффект в большинстве случаев (62,5%) ассоциировался с незначительной степенью патоморфоза в опухоли. И лишь в (37,5%) случаев наблюдался отчетливый лечебный патоморфоз.

В группе больных с выраженным клиническим эффектом после неoadъювантного этапа незначительная степень патоморфоза опухолевой ткани практически не наблюдалась. В абсолютном большинстве случаев (87,5%) отмечена отчетливая степень морфологических изменений.

У пациенток группы умеренно-выраженного клинического эффекта незначительный и отчетливый лечебный патоморфоз наблюдался в сопоставимых пропорциях (41,7 и 58,3%, соответственно).

Взаимосвязь между признаками была высокодостоверна: $p=0,019$ (рис. 3). Из числа иммунофенотипических маркеров рака молочной железы только один – VLA β – был взаимосвязан со степенью регрессии опухоли.

При нарастании уровней экспрессии CD29 на опухолевых клетках чувствительность к проводимой химиотерапии снижалась. При CD 29–негативных опухолях минимального эффекта не наблюдалось, при мозаичной экспрессии пропорция таких больных составила 25,0 % , а при мономорфной экспрессии CD29 – в 37,5 % случаев неoadъювантное лечение было менее эффективным.

Напротив, случаев с выраженным эффектом при наличии CD29 на всех опухолевых клетках практически не наблюдали (1 случай из 16; 6,0 %; рис. 4).

Results and discussion

Tumor cell immunophenotyping was made before and after neoadjuvant chemotherapy both in the total patient population and in subpopulations with respect to chemotherapy schedule (CAF or CMF VP). The study included analysis of expression by tumor cells of pancytokeratins (100% positive), integrins (CD29), transferrin receptor (CD71), HLA-I and II molecules, CD95 (apoptosis-mediating receptor), antigens MUC-1 and CD54 (ICAM-1 intercellular adhesion molecule) and tumor infiltration by lymphocyte subpopulations (fig. 2). MUC1, CD71, HLA-1 and CD29 common β -chain were most frequently expressed molecules.

It was interesting to analyze relationship between breast cancer cell immunophenotype and response to neoadjuvant chemotherapy. Response to chemotherapy was assessed by clinical and x-ray tumor regression and grade of pathomorphosis in tumor tissue.

These two factors appeared interrelated significantly. To make results of the analysis more demonstrative and informative we united pathomorphosis grades 0 with I (defined as mild or minimal) and II with III (definite, moderate).

Minimal clinical and x-ray response was associated with low-grade tumor pathomorphosis in most (62.5%) of cases, while definite pathomorphosis was seen in 37.5% of cases only.

Few patients with marked clinical response to neoadjuvant chemotherapy had minimal pathomorphosis. Absolute majority (87.5%) of these cases presented with definite morphological changes.

In patients with moderate clinical effect low and definite therapeutic pathomorphoses were found in similar proportions (41.7% vs. 58.3%, respectively).

Relationship between these signs was highly significant ($p=0.019$; fig. 3).

VLA β was the only breast cancer immunophenotype marker related to degree of tumor regression.

Sensitivity to chemotherapy was reducing with increase in CD29 expression on tumor cells. There were no minimal responses among CD29-negative cases, minimal responses were 25.0% among cases with mosaic and 37.5% among those with homogeneous expression of CD29.

And vice versa, only 1 of 16 patients with CD29 expression on all tumor cells (6.0%) demonstrated marked response to chemotherapy (fig. 4).

Таблица 1/Table 1

Распределение больных РМЖ по стадиям TNM/Distribution of breast cancer patients with respect to TNM stage.

Стадия/Stage	Количество больных абс./ n of Patients	Частота, %
IIб: T ₂ N ₁ M ₀	5	16,1
IIIа: T ₃ N ₁ M ₀	4	13,0
IIIб: T ₄ N ₀ M ₀ T ₄ N ₁ M ₀ T ₄ N ₂ M ₀	3	9,7
	10	32,2
	9	29,0
Всего/Total	31	100

Таблица 2/Table 2

Распределение больных раком молочной железы в зависимости от гистологической формы опухоли/Distribution of breast cancer patients with respect to tumor histology.

Гистологический тип опухоли/Tumor histology	Количество больных абс./Patients	Частота, %
Инфильтративный протоковый рак/Infiltrative ductal carcinoma	23	74,2
Инфильтративный дольковый рак/Infiltrative lobular carcinoma	7	22,6
Слизистый рак/Mucinous carcinoma	1	3,2

Таблица 3/Table 3

Клинико-рентгенологический эффект в процессе неoadъювантной терапии у больных РМЖ (вне зависимости от примененной схемы)/Clinical and x-ray response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients (total population).

Вариант регрессии/ Regression intensity	Количество больных/n of Patients	
	Абс.	%
Выраженный/Marked (>50%)	8	25,8
Умеренный/Moderate (>25%)	14	45,2
Минимальный/Minimal (<25%)	9	29,0
Итого/Total:	31	100

Таблица 4/Table 4

Взаимосвязь между наличием активированных лимфоцитов (CD25⁺) в ткани опухоли и выраженностью Т-клеточной реакции/Relationship between the presence of activated lymphocytes (CD25⁺) in tumor tissue and T-cell reaction intensity.

CD25 ⁺ клетки/cells	Т-клеточная реакция/T-cell reaction	
	Слабая/Weak	Выраженная/Intense
Отсутствуют/Absent	12 (60%)	8 (40%)
Присутствуют/Present	4 (36,4%)	7 (63,6%)

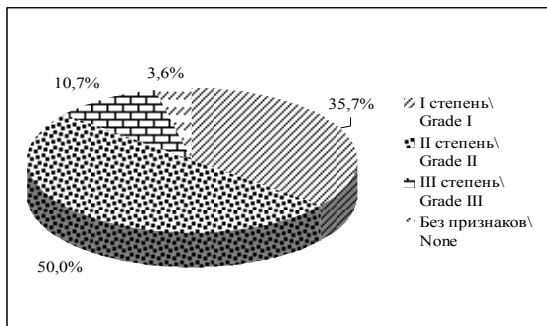


Рис. 1. Распределение больных РМЖ в зависимости от выраженности лечебного патоморфоза/**Fig. 1.** Distribution of breast cancer patients with respect to grade of therapeutic pathomorphosis.

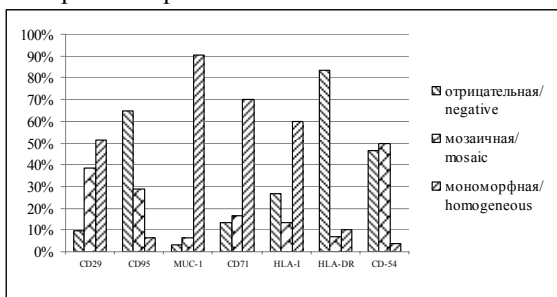


Рис. 2. Иммунофенотип клеток рака молочной железы/**Fig. 2.** Breast cancer cells immunophenotypes.

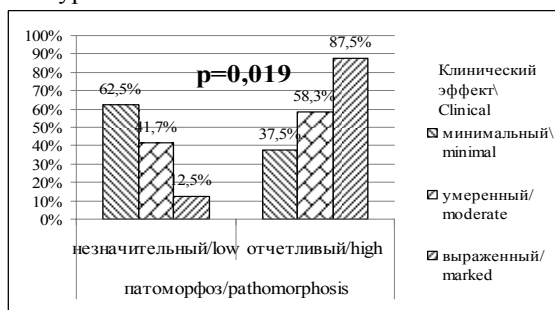


Рис. 3. Взаимосвязь клинического и морфологического регресса опухоли в процессе неoadъювантной химиотерапии у больных РМЖ/**Fig. 3.** Relationship between clinical and morphological response to neoadjuvant chemotherapy in BC patients.

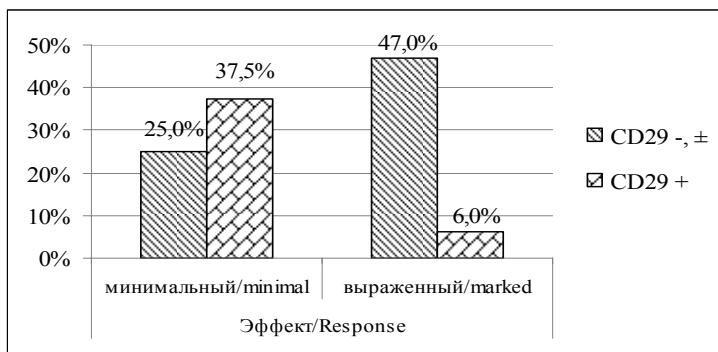


Рис. 4. Взаимосвязь экспрессии CD29 на клетках РМЖ с эффективностью неоадьювантной химиотерапии/**Fig. 4.** Relationship between CD29 expression on BC cells and tumor response to neoadjuvant chemotherapy.

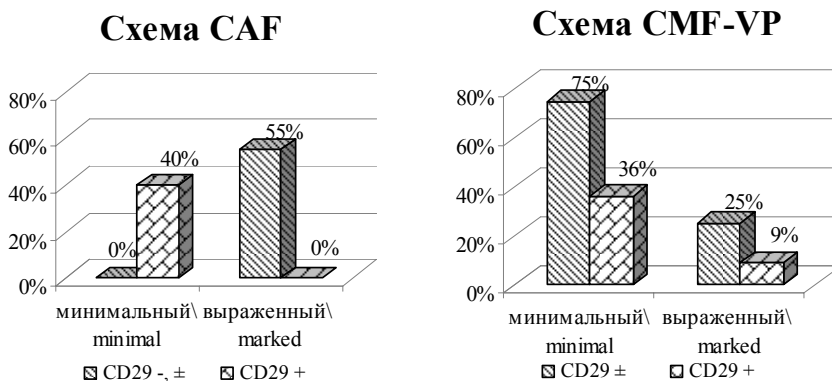


Рис. 5. Взаимосвязь экспрессии CD29 на опухолевых клетках с эффективностью неоадьювантной химиотерапии/**Fig. 5.** Relationship between CD29 expression on tumor cells and tumor response to neoadjuvant chemotherapy.

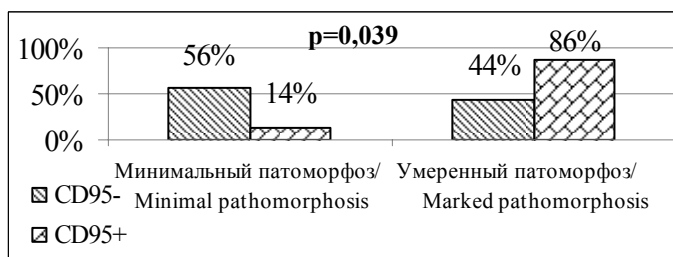


Рис. 6. Выраженность патоморфоза опухолевой ткани (схема CAF) в зависимости от экспрессии CD95 на опухолевых клетках/**Fig. 6.** Tumor tissue pathomorphosis intensity (CAF) with respect to CD95 expression on tumor cells.

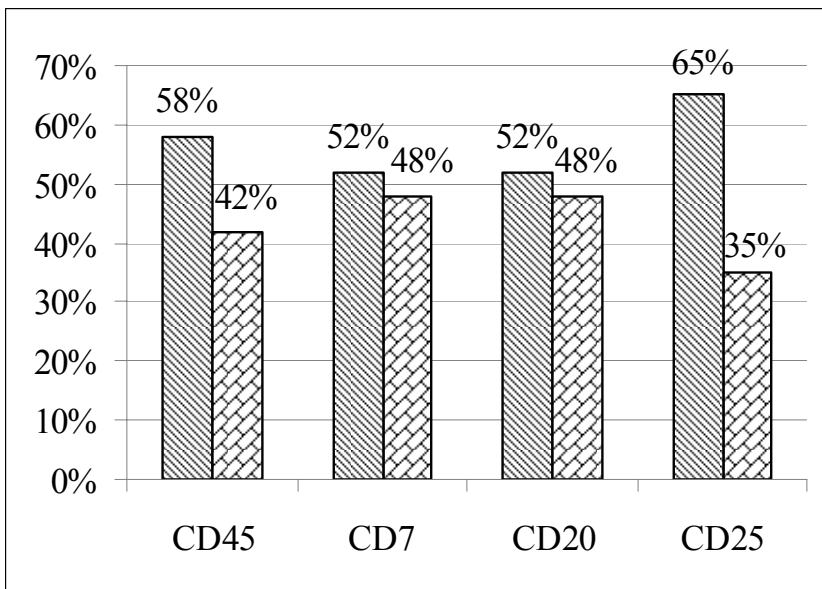


Рис. 7. Субпопуляции лимфоцитов в ткани молочной железы/**Fig. 7.** Lymphocyte subpopulations in breast cancer tissue.

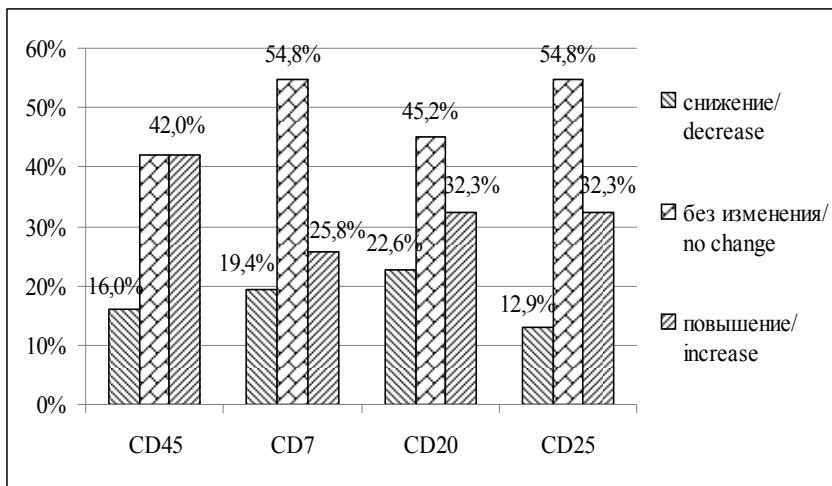


Рис. 8. Динамика интратуморальной лимфоидной инфильтрации опухоли в процессе неадьювантной химиотерапии/**Fig. 8.** Changes in intratumoral lymphoid infiltration during neoadjuvant chemotherapy.

Дальнейший анализ проведен с учетом схемы неoadъювантной химиотерапии. Интересно отметить, что интегрины VLA- β были информативны только при использовании схемы CAF, у этих больных достоверность связи возрастала в сравнении с общей группой (рис. 5). При анализе патоморфоза наиболее информативным оказался рецептор апоптоза CD95.

В целом по группе больных достоверной связи выраженности патоморфоза с экспрессией CD95 не отмечено ($p=0,08$). В группе пациенток, получавших CAF, установлено: по мере нарастания экспрессии CD95 от отрицательной до мономорфной частота умеренно-выраженного патоморфоза возрастает с 44 до 86%. Минимальный патоморфоз при отсутствии CD95 составил 56%, в присутствии указанных клеток – 14% (различия достоверны, рис. 6).

Мы проанализировали динамику изменения иммунофенотипа клеток рака молочной железы до и после неoadъювантной химиотерапии. Из числа изученных маркеров только CD95 изменял профиль экспрессии, остальные достоверно не различались.

В случаях экспрессии CD95 полная элиминация клеток, несущих антиген, под действием химиотерапии по схеме CAF наблюдалась в 55% случаев. Это позволяет предположить, что именно CD95⁺ клетки являются мишенью химиотерапии.

Далее оценим взаимосвязь лимфоидной инфильтрации опухоли и эффекта неoadъювантной химиотерапии. Изучены важнейшие субпопуляции интратуморальных лимфоцитов, уровни:

- общий уровень лимфоидной инфильтрации по CD45;
- Т-клеток (CD7);
- активированных клеток (CD25);
- В-лимфоцитов (CD20).

Преобладали умеренная и выраженная лимфоидная и Т-клеточная инфильтрации, уровни В-клеток были, как правило, низкими. В 35% случаев в ткани рака молочной железы присутствовали активированные (CD25⁺) лимфоциты (рис. 7).

В процессе неoadъювантной химиотерапии уровни инфильтрации опухоли различными субпопуляциями лимфоцитов изменялись, однако, закономерностей в этом процессе мы не отметили. Чаще всего уровни инфильтрации оставались такими же, как до проведения неoadъювантной химиотерапии. Повышение их уровней в сравнении с исходными значениями отмечено чаще, чем снижение. Это является косвенным опровержением представления о том, что химиотерапия действует, в первую очередь, на лимфоидную систему, включая интратуморальную (рис. 8).

Динамика интратуморальных лимфоцитов не была взаимосвязана с исходным фенотипом опухоли и ответом (клинико-рентгенологическим, морфологическим) на неoadъювантную химиотерапию. Единственным исключением является антиген CD25 в группе больных, получавших режим CMF VP.

We continued our study in patient subpopulations with respect to neoadjuvant chemotherapy schedule given. Of interest that VLA- β integrins were informative only in patients receiving CAF regimen who demonstrated increased significance of the relationship in comparison with the total population (fig. 5). Apoptosis receptor CD95 was most informative in pathomorphosis analysis.

There was no significant relationship ($p=0.08$) between pathomorphosis grade and CD95 expression in the total population. In the CAF group rate of moderate pathomorphosis was increasing from 44 to 86% with rise in CD95 expression from negative to homogeneous. Minimal pathomorphosis was 56% in the absence and 14% in the presence of CD95. Relationship between these signs was significant (fig. 6).

We analyzed changes in breast cancer cell immunophenotype before and after neoadjuvant chemotherapy. Among the markers studied only CD95 demonstrated changes in expression while others had their expression unchanged.

In CD95-positive subpopulation complete elimination of antigen-expressing cells under the effect of CAF chemotherapy was discovered in 55% of cases. This suggests CD95-positive cells to be chemotherapy targets.

We continued our study with analysis of relationship between tumor lymphoid infiltration and response to neoadjuvant chemotherapy. The following important subpopulations of intratumoral lymphocytes were studied:

- total lymphoid infiltration (CD45)
- T-cells (CD7)
- activated cells (CD25)
- B-lymphocytes (CD20)

Moderate and marked lymphoid and T-cell infiltrations were prevalent, while B-cell levels were as a rule low. 35% of breast cancer tissue specimens contained activated (CD25⁺) lymphocytes (fig. 7)

Levels of tumor infiltration by lymphocyte subpopulations were changing during chemotherapy, though we failed to find any regularity in these changes. Most often infiltration levels remained the same as before neoadjuvant chemotherapy. They increased more frequently than decreased. This observation refutes indirectly the assumption that chemotherapy first of all affects lymphoid, including intratumoral, system (fig. 8).

Changes in intratumoral lymphocyte levels were not related to tumor initial phenotype or response (clinical, x-ray or morphologic) to neoadjuvant chemotherapy. CD25 in the CMF VP group was the only exception.

При возрастании уровней $CD25^{+}$ –клеток минимального эффекта не отмечалось: он был выраженным в четверти клинических случаев и умеренно выраженным в 75% наблюдений.

Таким образом, наиболее уязвимые с точки зрения представлений о химиотерапевтическом воздействии активированные, пролиферирующие Т-клетки ($CD25^{+}$) в значительной части случаев не элиминируются в процессе неоадьювантной химиотерапии, а, напротив, их число возрастает, что ассоциируется с эффективностью схемы CMF–VP. Именно в этих случаях мы отмечали только умеренный или выраженный эффект (рис. 9).

Тем не менее, не столько динамика, сколько исходный профиль инфильтрации опухоли субпопуляциями лимфоцитов, влиял (или, точнее, был ассоциирован с эффективностью химиотерапии). Мы оценили, насколько уровень инфильтрации опухоли (до начала лечения) может быть взаимосвязан с эффектом неоадьювантной химиотерапии – регрессией опухоли по клинко-рентгенологическим данным. При нарастании инфильтрации опухоли Т-клетками частота выраженной регрессии опухоли по клинко-рентгенологическим данным возросла с 7 до 47%. Полученные данные свидетельствуют о том, что предсуществующие в опухоли Т-клетки создают благоприятный фон (своего рода потенцирование) для противоопухолевого действия химиотерапии (рис. 10).

Мы не отметили достоверной связи уровней лимфоидной инфильтрации ($CD45$) с выраженностью клинко-рентгенологической регрессии. Результаты были сходными в обеих группах. Так, при наличии значительной инфильтрации опухоли частота выраженных эффектов была несколько выше и составила 31% по сравнению с группой пациентов, инфильтрация опухолей которых была незначительной – 22%. Что касается В–клеточной инфильтрации, здесь мы взаимосвязности не выявили. Чрезвычайно интересным оказался анализ сопоставлений взаимосвязи уровней активации интратуморальных лимфоцитов с противоопухолевым эффектом неоадьювантной терапии. У большинства пациентов показатели активации (экспрессия $CD25$ на лимфоцитах) были минимальными или соответствующие клетки практически отсутствовали в опухолевых срезах. У 36% больных отчетливая пропорция $CD25^{+}$ лимфоцитов присутствовала в опухолевых срезах. При наличии активированных интратуморальных лимфоцитов отчетливый противоопухолевый эффект наблюдался у 55% пациенток. В то время как при отсутствии $CD25^{+}$ клеток эффективность химиотерапии была в 5 раз ниже. Эти признаки достоверно взаимосвязаны, $p=0,005$. Иными словами, при наличии в ткани РМЖ отчетливой пропорции активированных лимфоцитов ($CD25^{+}$) эффективность неоадьювантной химиотерапии существенно повышается. Т.е. активация показателей интратуморального иммунитета потенцирует эффект лекарственного воздействия. Эти данные во многом напоминают взаимосвязи, отмеченные нами в отношении интратуморальных Т–лимфоцитов, однако, являются еще более достоверными (рис. 11).

None of cases with increasing CD25⁺ cell levels presented with minimal response, 75% achieved moderate and 25% had marked response.

We therefore demonstrated that activated, proliferating T-cells (CD25⁺) thought to be most sensitive to chemotherapy were increasing rather than eliminated during chemotherapy. The rise in the number of these cells was associated with response to CMF VP. Only such cases demonstrated moderate or marked response (fig. 9).

Nevertheless, it was initial profile of lymphocytic infiltration rather than its alteration that influenced (or, to put it more accurately, was associated with) response.

We analyzed relationship between baseline tumor infiltration and response to neoadjuvant chemotherapy (clinical and x-ray tumor regression).

Rate of marked clinical and x-ray tumor regression was increasing from 7 to 47% with rise in T-cell tumor infiltration. These findings suggest that preexisting T-cells made a favorable (potentiating) environment for chemotherapy anticancer activity (fig. 10).

Levels of lymphoid infiltrations (CD45) were not significantly related to magnitude of clinical and x-ray response. Outcomes in the groups were similar. In cases with intense tumor infiltration the rate of marked response was 31% versus 22% in patients with mild infiltration. B-cell infiltration was not related to response intensity.

It was interesting to compare intratumoral lymphocyte activation level and response to neoadjuvant chemotherapy. Most patients demonstrated minimal or no activation (CD25 expression on lymphocytes). 36% presented with a considerable proportion of CD25⁺ cells in tumor sections. Marked response to chemotherapy was detected in 55% of patients with activated intratumoral lymphocytes. In contrast, the response rate in cases without CD25⁺ cells was 5-fold lower. Relationship between these characteristics was statistically significant ($p=0.005$).

This means that response to neoadjuvant chemotherapy increases considerably in the presence of a marked proportion of activated lymphocytes (CD25⁺) in breast cancer tissue, or in other words, activation of intratumoral immunity factors potentiates response to drug therapy. These data are similar to our findings concerning intratumoral T-lymphocytes, though are still more significant (fig. 11).

Мы провели анализ взаимосвязи уровней активации лимфоцитов (CD25⁺ клетки) с выраженностью Т-клеточной интратуморальной реакции и не установили достоверной взаимосвязи между этими признаками.

При наличии активированных лимфоцитов в ткани опухоли выраженная Т-клеточная реакция наблюдалась несколько чаще (63,6%), чем в их отсутствие. Однако признаки не взаимосвязаны. Следовательно, каждый показатель имеет самостоятельное значение в потенцировании противоопухолевого эффекта химиотерапии (табл. 4.).

С целью установления наиболее эффективной схемы неoadъювантного лечения с учетом иммунологических показателей интратуморальных иммунных реакций, мы проанализировали отдельно клинико-иммунологические ассоциации у больных, получавших лечение по схеме CAF, и у больных, получавших лечение по схеме CMF-VP.

Как и в целом по группе уровни CD45-лимфоцитов и В-клеток не были достоверно связаны с эффектом химиотерапии. Значимость инфильтрации Т-клетками также снижалась. Это крайне важно, т.к. при любой из использованных схем отмечалась достоверная связь с активированными клетками CD25 ($p=0,045$ при использовании схемы CAF; $p=0,02$ при использовании CMF-VP).

При проведении анализа уровней инфильтрации ткани РМЖ различными субпопуляциями лимфоцитов до лечения (материал кор-биопсий) и степени патоморфоза хирургически удаленных опухолей после лекарственного лечения, получены следующие результаты: нарастание уровней лимфоидной инфильтрации и, в частности, Т-лимфоцитов сопровождалось большим патоморфозом опухолевой ткани. При значительной инфильтрации опухоли CD45⁺ клетками умеренный патоморфоз наблюдался вдвое чаще, чем минимальный (67 и 33%). Аналогичные данные получены для Т-клеток (CD7⁺) – (73 и 27%). Достоверные связи с выраженностью патоморфоза получены для субпопуляции активированных Т-лимфоцитов (CD25⁺) – девятикратное преобладание умеренного патоморфоза над минимальным (90 и 10%) в случаях наличия CD25⁺ лимфоцитов в опухолевой ткани до начала лечения. Создается впечатление, что наличие в опухолевой ткани активированных Т-лимфоцитов привносит своего рода синергидное или потенцирующее действие в отношении влияния химиопрепаратов на опухолевую ткань. Хотя пропорция этих клеток в опухолевой ткани была, как правило, небольшой, именно они, а не Т-клетки в целом, имели достоверную связь с выраженностью патоморфоза. Этот факт легко объясним, ведь только активированные Т-лимфоциты-киллеры (CD25⁺) способны оказывать цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток. В настоящее время широко обсуждается роль Т-регуляторных клеток, которые также экспрессируют CD25, но способны супрессировать противоопухолевое действие Т-лимфоцитов. Наши данные свидетельствуют о том, что экспрессия CD25 на интратуморальных лимфоцитах в процессе химиотерапии в основном нарастает, что ассоциируется с положительным эффектом лечения.

Relationship between lymphocyte activation (CD25⁺ cells) and intensity of intratumoral T-cell reactivity was not significant.

Marked T-cell reaction was observed somewhat more frequently (63.6%) in the presence than in the absence of activated lymphocytes in tumor tissue. Although these factors were not interrelated. This means that each of the analyzed parameters plays a role of its own in potentiating response to chemotherapy (tab. 4).

In order to establish optimal schedule of neoadjuvant chemotherapy with respect to immunologic features of intratumoral immune reactions we analyzed separately clinicoimmunologic associations in patients receiving CAF versus CMF-VP chemotherapies.

Like in the total population, analysis in these subgroups demonstrated that levels of CD45-lymphocytes and B-cells were not related with response to chemotherapy. Significance of T-cell infiltration was also decreasing. This observation is of much importance since response to both schedules was related to levels of activated (CD25) cells ($p=0.045$ in the CAF group and $p=0.02$ in the CMF VP group).

Analysis of breast cancer tissue infiltration by various lymphocyte subpopulations at baseline (core-biopsies) and pathomorphosis grade in the removed tumor after chemotherapy demonstrated that increased levels of lymphoid, in particular, T-cell infiltration were associated with more intensive therapeutic pathomorphosis. In cases with marked tumor infiltration by CD45⁺ cells moderate pathomorphosis was found 2-fold more frequently than minimal one (67% vs. 33%). Results concerning T-cells (CD7⁺) were similar: 73% vs. 27%. Significant relationship with pathomorphosis intensity was established for activated T-lymphocytes (CD25⁺) with a 9-fold greater rate of moderate pathomorphosis as compared to minimal changes (90% vs. 10%) in the presence of CD25⁺ lymphocytes in tumor tissue before treatment. It seems that the presence of activated T-lymphocytes in tumor tissue produces a synergic or potentiating effect on response to chemotherapy. Although proportion of these cells in tumor tissue was not as a rule large, it was this subpopulation rather than T-cells as a whole that demonstrated significant relationship with pathomorphosis intensity. This observation is easily explainable, because it is activated T-killers (CD25⁺) that can produce cytotoxic action on tumor cells. There is currently much dispute about the role of T-regulatory cells that also express CD25, though can suppress T-lymphocyte antitumor activity. Our findings demonstrated that CD25 expression on intratumoral lymphocytes was mainly increasing during chemotherapy which was associated with response to treatment.

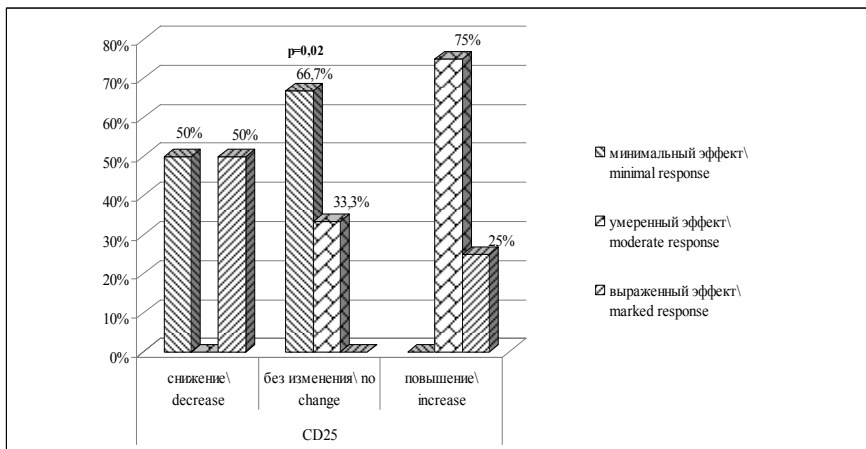


Рис. 9. Эффективность схемы CMF VP в зависимости от динамики уровней активированных лимфоцитов (CD25⁺) в опухоли/**Fig. 9.** Response to CMF VP chemotherapy with respect to changes in levels of activated lymphocyte (CD25⁺) in tumors.

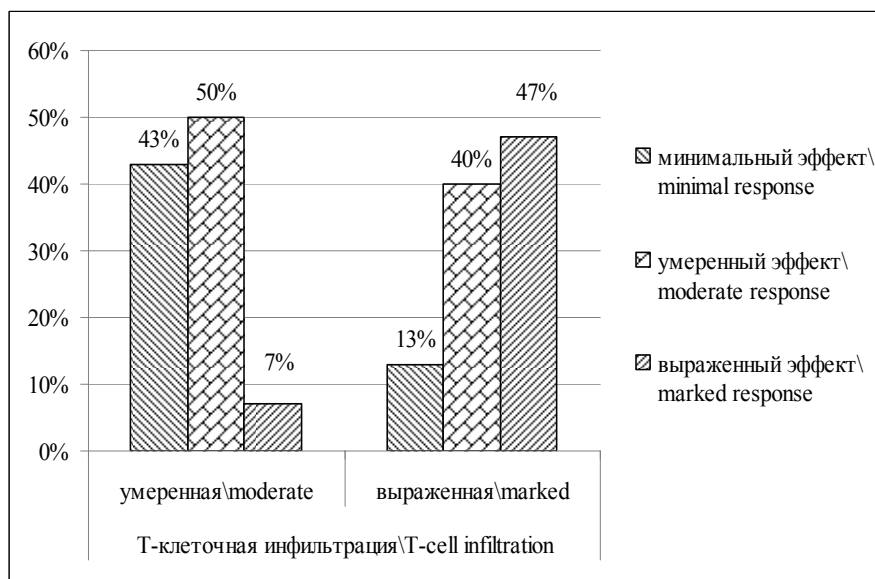


Рис. 10. Эффективность неoadъювантной химиотерапии РМЖ у больных с различным уровнем интратуморальных Т-клеток/**Fig. 10.** Response to neoadjuvant chemotherapy in patients with different levels of intratumoral T-cells.

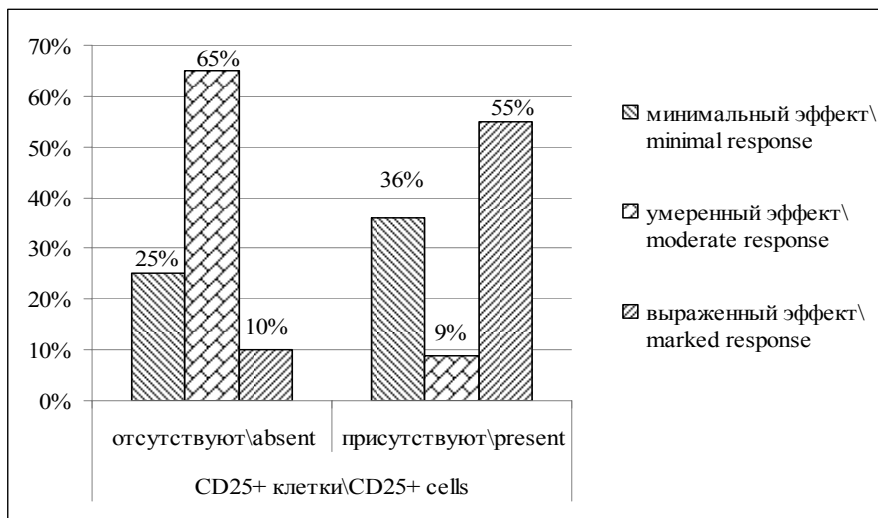


Рис. 11. Эффективность неoadъювантной химиотерапии рака молочной железы с различным уровнем CD25⁺ клеток/**Fig. 11.** Response to neoadjuvant chemotherapy in patients with different levels of CD25⁺ cells.

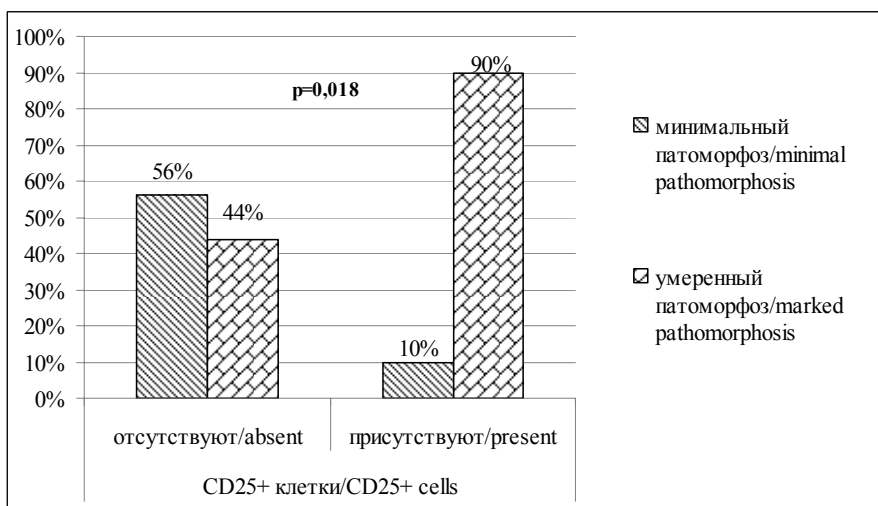


Рис. 12. Взаимосвязь лечебного патоморфоза с наличием активированных лимфоцитов в опухолевой ткани/**Fig. 12.** Relationship between therapeutic pathomorphosis and the presence of activated lymphocytes in tumor tissue.

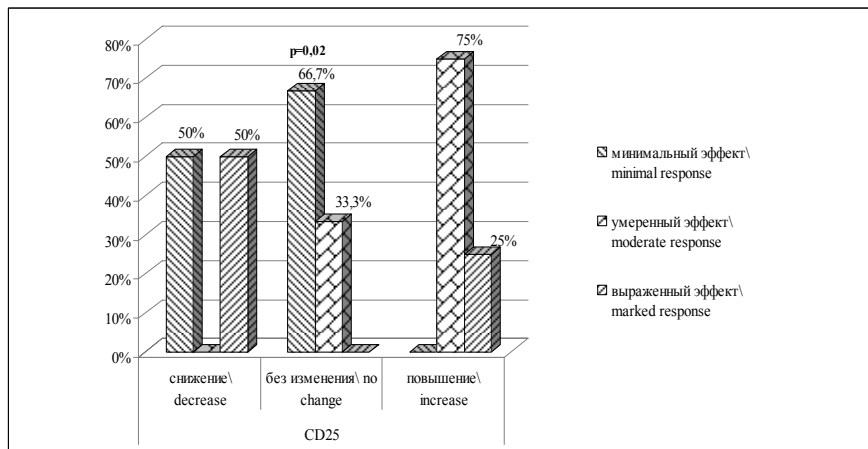


Рис. 9. Эффективность схемы CMF VP в зависимости от динамики уровней активированных лимфоцитов (CD25⁺) в опухоли/**Fig. 9.** Response to CMF VP chemotherapy with respect to changes in levels of activated lymphocyte (CD25⁺) in tumors.

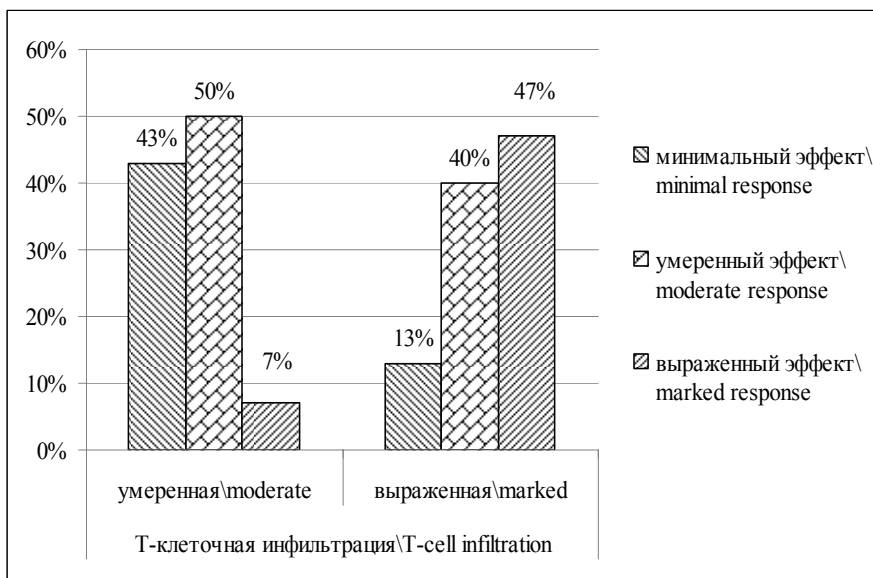


Рис. 10. Эффективность неoadъювантной химиотерапии РМЖ у больных с различным уровнем интратуморальных Т-клеток/**Fig. 10.** Response to neoadjuvant chemotherapy in patients with different levels of intratumoral T-cells.

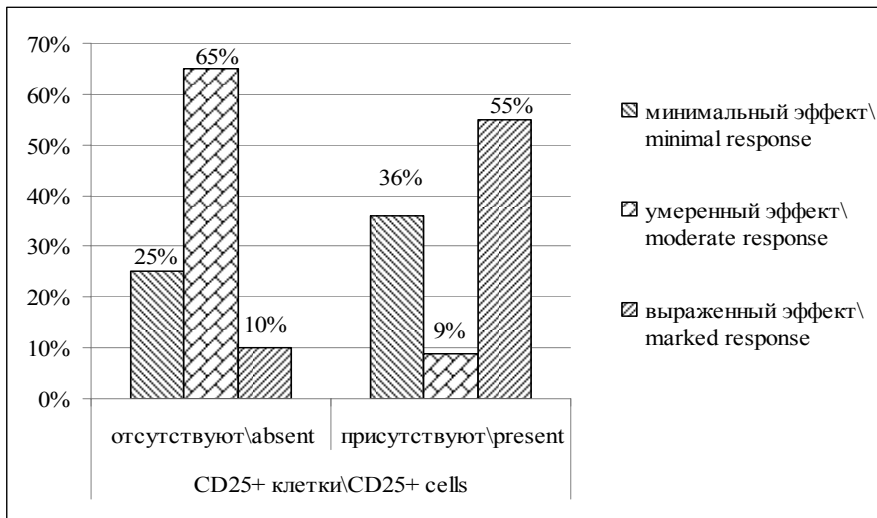


Рис. 11. Эффективность неадьювантной химиотерапии рака молочной железы с различным уровнем CD25⁺ клеток/**Fig. 11.** Response to neoadjuvant chemotherapy in patients with different levels of CD25⁺ cells.

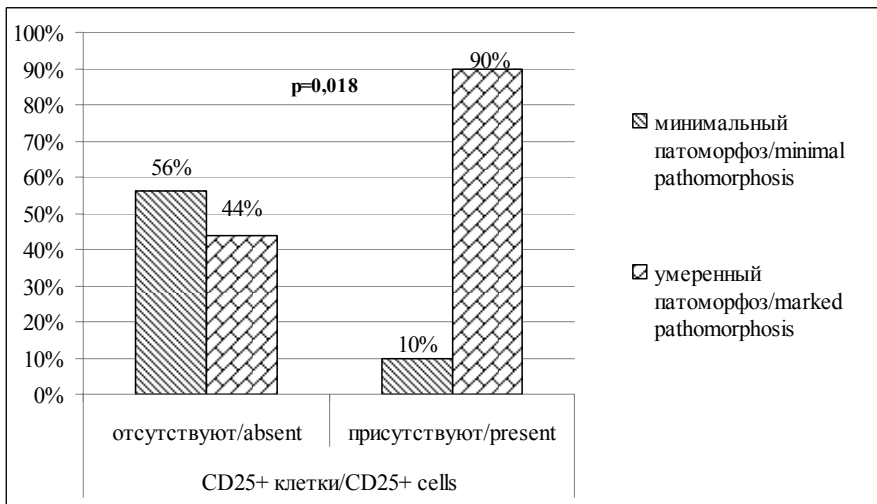


Рис. 12. Взаимосвязь лечебного патоморфоза с наличием активированных лимфоцитов в опухолевой ткани/**Fig. 12.** Relationship between therapeutic pathomorphosis and the presence of activated lymphocytes in tumor tissue.

По-видимому, данный антиген преимущественно представлен на Т-киллерах, а не на Т-регуляторных лимфоцитах в опухолевой ткани (рис. 12).

Далее мы оценили связь лимфоидной инфильтрации с эффектом режимов CAF и CMF-VP.

Выраженность патоморфоза не была взаимосвязана с уровнями Т-клеточной инфильтрации опухоли. Достоверная связь с эффективностью химиотерапии имела место в случаях наличия в опухолевой ткани активированных Т-лимфоцитов (CD25⁺). Обнаружение этих клеток при исследовании опухолевой ткани до назначения химиотерапии ассоциировалось с большей выраженностью лекарственного патоморфоза. Более всего это было выражено в группе пациенток получавших антрациклины ($p=0,014$).

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что иммунофенотип клеток рака молочной железы и уровни лимфоидной инфильтрации опухоли субпопуляциями лимфоцитов имеют взаимосвязь с эффективностью неоадьювантной химиотерапии.

Из выбранных параметров наиболее значимыми в плане оценки прогноза и ответа на индукционную терапию следует отметить CD29, CD95, CD7 и CD25.

Резюме

Исследованию иммунофенотипа рака молочной железы и субпопуляций интратуморальных лимфоцитов в настоящее время уделяется большое внимание [10], однако, клиническое значение этих исследований с точки зрения чувствительности опухоли к химиотерапии не известно. В настоящей работе предпринята попытка ответить на этот вопрос.

Нами выявлена взаимосвязь между иммунофенотипическими особенностями рака молочной железы и эффективностью неоадьювантной химиотерапии. Установлено, что полихимиотерапия в режиме CAF селективно элиминирует CD95⁺, что позволяет добиться большей степени выраженности патоморфоза в CD95⁺ группе больных. Это свидетельствует о большей эффективности лечения антрациклин-содержащими комбинациями. Данный факт, впервые установленный в нашем исследовании, позволяет корректировать индукционное лечение с учетом иммунологического фенотипа клеток рака молочной железы.

В работе продемонстрирована зависимость эффекта химиотерапии (регрессия опухоли) от иммунофенотипических особенностей рака молочной железы. Установлена высокая информативность экспрессии общей β -цепи интегринов CD29 и рецептора апоптоза FAS/APO-1(CD95) на опухолевых клетках.

This antigen seems to be present mainly on T-killers rather than on T-regulatory lymphocytes in tumor tissue (fig. 12).

Pathomorphosis intensity was not related with T-cell infiltration of tumors. Significant relationship with response to chemotherapy was established in the presence of activated T-lymphocytes (CD25⁺) in tumor tissue. Detection of these cells in tumor specimens before treatment was associated with higher therapeutic pathomorphosis intensity. This effect was more marked on anthracycline therapy ($p=0.014$).

Therefore, our study demonstrated that breast cancer cell immunophenotype and level of tumor infiltration by lymphocyte subpopulations were related to response to neoadjuvant chemotherapy.

CD29, CD95, CD7 and CD25 were most significant factors for prognosis and evaluation of response.

Summary

Intense research in breast cancer currently focuses on tumor immunophenotype and intratumoral lymphocyte subpopulations [10], however, clinical significance of these factors as to tumor sensitivity to chemotherapy is unknown. We have attempted to elucidate this problem and established relationship between some features of breast cancer immunophenotype and response to neoadjuvant chemotherapy. CAF polychemotherapy was found to selectively eliminate CD95-positive cells which resulted in a more intensive pathomorphosis in CD95-positive patient population. This finding was proved by higher efficacy of anthracycline-containing therapies. This observation made for the first time in our study allows induction therapy to be corrected with respect to breast cancer immunophenotype.

Our study demonstrated that response to chemotherapy (tumor regression) depended on breast cancer immunophenotype. Expressions of CD29 common β -chain and apoptosis receptor FAS/APO-1 (CD95) on tumor cells were found highly informative.

Определена достоверная взаимосвязь между уровнями инфильтрации ткани рака молочной железы различными субпопуляциями лимфоцитов до назначения неoadъювантной химиотерапии и степенью выраженности патоморфоза удаленной опухоли. Выраженность патоморфоза коррелировала с уровнями лимфоцитарной инфильтрации опухоли. Достоверная связь с эффективностью химиотерапии имела место в случаях наличия в опухолевой ткани активированных Т-лимфоцитов (CD25⁺). Обнаружение этих клеток при исследовании опухолевой ткани до начала химиотерапии ассоциировалось с большей выраженностью лекарственного патоморфоза в удаленной опухоли. Активированные лимфоциты играли роль в выраженности патоморфоза только в случаях проведения антрациклин-содержащими схемами.

Полученные в настоящем исследовании результаты имеют большое практическое значение, поскольку позволяют в определенной степени предсказать ответ на различное неoadъювантное лечение больных местно-распространенным раком молочной железы на основе первичного иммунофенотипа опухолевых клеток и его изменения в процессе химиотерапии. Это позволяет выбирать наиболее эффективный вариант предоперационного лекарственного лечения.

Всего 20 лет назад роль иммунологических исследований в диагностике лимфом и выборе тактики лекарственного лечения не была определена: отсутствовали классификация ВОЗ 2001 г [11] и предшествующая ей REAL-классификация, не имела широкого распространения Модифицированная Кильская классификация, и лечение во много базировалось на морфологических критериях Рабочей формулировки (Working Formulation). В настоящее время иммунодиагностику лимфом невозможно представить без применения иммуногистохимических и проточно-цитометрических методов [11; 12]. Именно они дают ключ к установлению диагноза, констатации полной ремиссии и оценке минимальной резидуальной болезни.

При солидных опухолях этот путь еще предстоит пройти. И нами сделан первый шаг в этом направлении. Есть все основания считать, что рак молочной железы может быть разделен на группы, различающиеся по чувствительности к химиотерапии как на основании иммунофенотипа опухолевых клеток (CD29, CD95), так и на основании инфильтрации опухоли субпопуляциями Т-лимфоцитов (CD7, CD25). Эти маркеры могут быть рекомендованы как для выбора программ лечения, так и для мониторинга его эффективности.

Levels of breast cancer tissue infiltration by various lymphocyte populations before neoadjuvant chemotherapy were significantly related to pathomorphosis intensity in removed tumors. Pathomorphosis intensity correlated with levels of lymphocytic infiltration of tumors. The relationship with response to chemotherapy was significant in the presence of activated T-lymphocytes (CD25⁺) in tumor tissue. The presence of these cells in tumor specimens prior to chemotherapy was associated with higher grade of pathomorphosis in the removed tumor. Activated lymphocytes played a role in pathomorphosis intensity only in patients receiving anthracycline-containing regimens.

Our findings are of high clinical importance since they to a certain degree allow prediction of response to individual schedules of neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer basing on baseline cancer cell immunophenotype and its changes during chemotherapy. Therefore, a most efficient schedule may be chosen.

As recently as 20 years ago the role of immunologic study in the diagnosis of lymphoma and choice of treatment strategy was unknown, there was no WHO 2001 classification [11] or the preceding REAL system, the Modified Kiel classification was not widely applied and the treatment was mainly based on morphologic criteria of the Working Formulation. Today immunodiagnosis in lymphoma is hardly possible without immunohistochemical or flow-cytometry assays [11, 12]. They play a key role in the diagnosis, detection of complete remission and evaluation of minimal residual disease.

As to solid tumors we are just in the beginning of this road and have taken but the very first steps. There is strong evidence that the total group of breast cancers may be divided into subgroups with respect to sensitivity to chemotherapy by both tumor cell immunophenotype (CD29, CD95) and tumor infiltration by lymphocyte subpopulations (CD7, CD25). These markers may be recommended both to choose treatment programs and to monitor treatment efficacy.

Литература/Reference

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2005 г. /Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Т18, №2 (прилож.1). 2007.
2. Давыдов М.И., Летагин В.П. Практическое руководство по клинической маммологии. М., 2004. С.88.
3. Абашиш С.Ю. Неоадьювантная системная терапия в комплексном лечении местно-распространенного рака молочной железы. Современная онкология. №4. Т.2. 2000. С.133.
4. Veronesi U., Goldhirsch A., Yamold J. Breast cancer //In: Oxford textbook of oncology. Ed. by Peckham M., Pinedo H., Veronesi U. Oxford University Press., 1995. – P. 1241-92.
5. Тупицын Н.Н., Кадагидзе З.Г., Блохина Н.Г. и др. Экспрессия лейкоцитарных и родственных им антигенов на клетках рака молочной железы человека.//Эксперим. онколог. – 1990. – Т.12. – № 2. – С 54-8.
6. Артамонова Е.В., Огнерубов Н.А., Тупицын Н.Н., Летагин В.П. Рак молочной железы: иммунологические факторы прогноза. М., 2005. С. 217.
7. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Автореф. дисс... докт. мед. наук., Москва, 2003. 47 С.
8. Доросевич А.Е., Дубенская Л.И., Барышников А.Ю. и др. Экспрессия ряда лейкоцитарных и не лейкоцитарных антигенов в тканях рака молочной железы при местном радиационном воздействии как морфологическое проявление воздействия клеток паренхимы и стромы опухоли. //Архив патологии. – 1994. – Т. 56, N3. – С.51-5.
9. Барышников А.Ю., Тоневцкий А.Г. Моноклональные антитела в лаборатории и клинике. М., типография ВНИТЦ. – 1997. – С. 99-100.
10. Тупицын Н.Н. Иммунофенотип рака молочной железы. В кн. Рак молочной железы /Под ред. Н.Е.Кушлинского, С.М.Портного, К.П.Лактионова. – М.: Издательство РАМН, 2005. – С. 174-97.
11. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. (Eds). World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid System. IACR Press. Lyon, 2001, p. 75–108.
12. Тупицын Н.Н. Иммунодиагностика острых лейкозов и неходжкинских лимфом В: «Клиническая онкогематология». Руководство для врачей под ред. М.А.Волковой. М., Медицина. 2007 – С.338-69.

ПУШКИН И БРУНИ

Достопримечательностей у сравнительно молодого – послевоенного – города Ухты не так много. Одна из них – памятник А.С.Пушкину, установленный еще в 1937 году, когда кругом здесь были только лагеря. Да и поставлен он был по приказу лагерного начальства к 100-летию со дня смерти поэта невдалеке от Детского парка и Дома пионеров. К началу 1990-х памятник был уже в плачевном состоянии, так что вскоре его заколотили досками, и в таком виде, скрытый от людских глаз, монумент простоял много лет. И лишь к 200-летию поэта 6 июня 1999 года ухтинские художники, воссоздав в бронзе заново, открыли его на живописной Октябрьской (в прошлом Пушкинской) площади.

Автор памятника Николай Александрович Бруни (1891–1938) – человек-легенда, поэт, музыкант, скульптор и живописец, многогранная разносторонне одаренная личность трагической и трудной судьбы. Николай Александрович – потомок известного художника Антонио Баррофио-Бруни, который приехал из Италии в Россию еще в XVIII веке служить при дворе Петра Первого и здесь был возведен в дворянское достоинство. Пушкина в роду Бруни любили всегда. Федор Бруни, сын Антонио Баррофио, знал поэта лично и был удостоен чести рисовать его тело в гробу. Кто мог подумать, что один из потомков рода Бруни Николай Александрович создаст памятник Пушкину накануне собственной смерти, ведь после того, как памятник был установлен, автор был расстрелян. Короткой была жизнь этого удивительного человека, по биографии которого можно изучать историю русской интеллигенции, оставшейся в России после революции.

Николай Александрович родился 4 апреля 1891 года в Петербурге в семье Александра Александровича и Анны Александровны Бруни. Он получил общее образование в училище М.К. Тенишевой и музыкальное в консерватории по классу фортепьяно, был даже солистом Петербургской филармонии. Музыкальный мир России прочил ему блестящее будущее. В молодости Николай проявил склонность к языкам, знал несколько европейских и эсперанто. Как и многие в то «золотое» для России время, хорошо рисовал, писал

стихи и прозу. Результатом этого периода жизни было множество стихов и короткие яркие рассказы: «Кузьма-тележка», «Дорогой цветок» и др., опубликованные в «Гиперборее», «Новом журнале для всех». Ставший впоследствии тестем его младшего брата Льва К.Д. Бальмонт хвалил его литературные работы и даже посвятил ему стихотворение. Отдавая должное эпистолярному жанру и музыке, Николай был при этом отличным спортсменом, играл за сборную Петербурга по футболу. Но мирная жизнь быстро кончилась – в 1914 году началась Первая мировая война, которая потрясла молодого Николая Бруни. Он ушел на фронт санитаром-добровольцем, но писать не перестал. Литературный багаж того времени – рассказ «Записки санитар-добровольца» – живая история передней линии фронта. Но творческая душа звала в небо. И вот – авиация, строевая служба, краткосрочные курсы авиаторов при Петроградском политехническом институте, летная школа в Севастополе, и Бруни уже военный летчик. Говорили, что его отвага и мужество были удостоены Георгиевских крестов. В сентябре 1917 года во время ночного боевого вылета аэроплан Бруни был сбит под Одессой. Получив множественные ранения и переломы кистей рук, ног, и ребер, авиатор чудом остался жив. Спас ему жизнь большой серебряный крест, данный матерью и принявший на себя удар штурвалом в грудь. Вернувшись таким образом к жизни, Николай дал обет Господу, что станет священником. С трудом добравшись в апреле 1918 года до Москвы на переломанной и укороченной ноге, он поступил на службу командиром первого авиационного отряда Военно-воздушных сил РККА, но в начале 1919 года был комиссован по состоянию здоровья. В мае того же года Харьковский владыка Сергей рукоположил его вначале в дьяконы, а спустя некоторое время – в священники.

Здесь начинается вторая линия жизни отца Николая Бруни – служение Богу. Девять лет он был священнослужителем, и это были лучшие годы его жизни, несмотря на то, что не все складывалось на этом поприще гладко. Вначале он служил на Украине, в селе Будды Харьковской области, затем – в московской церкви Николы-на-Песках на Арбате. У Мандельштама есть произведение «Египетская марка». Один из персонажей – священник. Прототипом его как раз и стал сокурсник и друг – отец Николай Бруни. Вообще, он был знаком со многими известными личностями того времени. По отношению к любой несправедливости Николай Бруни был так же непримирим, как и многие иные российские интеллигенты: Мандельштам, Ахматова, Ходасевич, Флоренский и др. Он не только был с ними знаком и посвящал свои стихи, но и разделял участь многих. Когда служил в Москве, то после смерти Блока отслужил по нему панихиду. Начал с чтения стихов.

Будучи священником, Бруни служил бесплатно, т.к. еще в Москве примкнул к существовавшему тогда среди духовенства движению бессребреников. На хлеб для своей семьи, в которой была уже жена Анна и двое детей, отец Бруни зарабатывал другим – резал ложки-поварешки, расписные игрушки.

Печки клал.

В конце 1920-х гг., уже после НЭПа, он стал ощущать давление, как церкви – за бесплатное служение, так и власти. Когда отобрали приход в Москве, он сменил еще несколько приходов. Служил в селе Косынь, где встречался с Павлом Флоренским, потом в Клину, где жил в доме Петра Ильича Чайковского. Один из священнослужителей, хорошо знавший его, свидетельствует об отце Николае как о стойком «тихоновце».

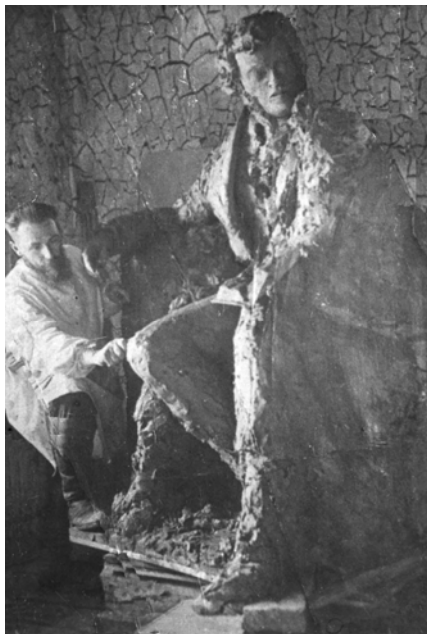
«При развитии обновленчества, – пишет этот батюшка, – отец Николай был в г. Козельске Калужской губернии. И один устоял в православии, и до селе остается твердым и непоколебимым православным и горячо ревностным пастырем...». Сан Бруни сложил с себя после жесткой реакции на то, что он отпевал Александра Блока.

Оставив священство, он возвратился в Москву, где друзья устроили его переводчиком в ЦАГИ (ныне МАИ). И здесь неумный талант Бруни проявился всей силой. Он не только переводил из нескольких языков техническую литературу различного направления, но и сам интенсивно конструировал. Как Леонардо да Винчи, его занимал вертикальный взлет летательных аппаратов. И... удалось. Он сделал новую кинематическую схему автомата перекоса несущего винта вертолета, которая и до сих пор используется во всем мире. Как жаль, что Бруни «из бывших» не мог даже заикнуться о своем авторстве. Об этом знали только его родные и друзья. Но, видимо, это авторство все же сыграло роковую роль в его судьбе. Арестовали Николая в декабре 1934-го. Тогда в Москву по приглашению института в качестве консультанта и авиаконструктора приехал знаменитый французский летчик Жан Пуатисс. Бруни попросили быть у него гидом и переводчиком. Хорошее знание французского языка сыграло злую шутку. На то, что он принимал гостя у себя дома, последовал донос.



Николай Александрович Бруни,
46 лет, автопортрет
Ухтпечлаг, 1937 г.

И после визита французского летчика Бруни объявили по 58-й статье шпионом в пользу Франции, что в те годы было обычным явлением. Дали пять лет исправительно-трудовых лагерей и сослали в Чибью (ныне Ухта) Коми АССР. Через два года, уже в лагере, Николая Александровича осудили повторно и дали еще десять лет лагерей.



1937 г. Ухтпечлаг.
Работа над памятником

Ухта в то время была одним из самых страшных мест, здесь сгинули тысячи и тысячи заключенных. И вот, Николай Бруни тоже оказался в «Ухтпечлаге» на реке Ухтарка. Ныне это территория города, а тогда – дикая тайга и болота. В тридцатых годах здесь как таковых зон за колючей проволокой еще не было: просто некуда было бежать. Лагерное начальство скоро узнало о художественных способностях Бруни и, забрав его с общих работ – лесоповала – поручило оформление лагерных клубов. Начальники заказывали свои портреты, портреты своих жен и детей. Затем ему даже выделили мастерскую, в которой и создал памятник Пушкину из подручных материалов – кирпича, глины, гипса, цемента и досок, каркас заменила колючая проволока. Удивительно, что монумент при этом простоял шесть десятков лет. Горячо любя А.С. Пушкина, работая за Полярным кругом в неотапливаемом сарае, трясаясь от холода зимой, он сделал не карманный вариант, а вылепил фигуру поэта в полный рост, сидящим в печальной задумчивости. Наверное, это не случайно. Не мог один обреченный на смерть поэт, не понять другого, обреченного на смерть поэта.

Он писал в то время:

*«... Надоели мне крылья и ряса,
не хочу ни стихов, ни сонат.
Слышу шорох предсмертного часа
В тишине убеленных палат...»*

Пушкин как бы отблагодарил Бруни за создание памятника: в качестве вознаграждения ему дали самое высокое для него счастье – осенью 1937 года последнее свидание с женой....

Именно этот дар Александра Сергеевича позволил Бруни передать жене свои стихи и автопортрет, которые впоследствии стали огромным подарком всем его потомкам.

О том, как погиб Бруни, рассказал родственникам очевидец, чудом спасшийся во время расстрелов. В середине 1950-х, когда рухнула лагерная система, он добрался до Москвы. Перед расстрелом отец Николай, как называл его этот вестник смерти, призвал всех приговоренных перестать богохульствовать, ругаться и отчаиваться, а смиренно встать на колени и молиться, а сам повернулся спиной к открытому рву, обратился к Богу и запел молитву.

Николай Бруни, родив много детей, был прав. Наступило время, когда его потомки после страшного времени «молчания» о репрессированных родных, получили возможность говорить о нем. Как бы он был счастлив узнать, что все его дети пережили довоенный террор, войну и послевоенные годы. Несмотря на то, что трое из его дочерей и жена прошли немецкий плен и были репрессированы после войны в России, все дети создали семьи и родили своих детей, многие из которых получили возможность реализовать духовное наследство, полученное от деда. Среди них: заслуженный артист России известный скрипач Алексей Бруни, педагог-художник Наталья Желтова, талантливые инженеры Александр Бруни, Георгий Мирза, Михаил Трещалин, Сергей и Николай Рожковы, Ольга Голованова, Татьяна Верженская, преподаватель английского языка Анна Голубева, художник Олег Лысенко и, наконец, более 20 лет проработавший в Онкологическом центре кандидат медицинских наук токсиколог Иван Трещалин.

Живущие ныне одна из дочерей Алла и многочисленные внуки Николая Александровича Бруни помнят его, любят, рассказывают о прадеде своим детям, которых уже более десятка, и читают им оставленные в наследство стихи и рассказы. Они надеются, что благодарная память и любовь искупит горечь страданий, которые ему довелось перенести.

Надпись, сделанная спустя 60 лет на восстановленном памятнике А.С.Пушкину в Ухте «Автор – Николай Александрович Бруни», стала также памятником и ему, как истинному русскому интеллигенту.

Е.М.Трещалина, И.Д.Трещалин

PROGRAMME

VI Annual Russian Conference with international participation

“HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY”

**(WORKING LANGUAGES – ENGLISH AND RUSSIAN.
SYNCHRONOUS TRANSLATION)**

June 7-8, 2009

Chairpersons:

**Honoured Chairman - Academician, Professor George Janossy (London,
UK) Professor Nikolai Tupitsyn (General Chairman-Coordinator)
Professor Z.G.Kadagidze
Professor P.Terasaki**

Location

**N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated
to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation Address:
Moscow, Kashirskoye shosse 24
(Conference Hall of Institute of Clinical Oncology)**

June 7, 2009 Registration

June 8, 2009 - Conference

9:00 - 10:00 *Registration & Conference*

Opening Ceremony. Introduction from Director of Cancer Research Center

Academician Professor Mikhail I. Davidov

Introductory words from professor Z.G. Kadagidze

10:00 - 13:00 *Morning session*

"Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation"

Chairpersons:

Professor Z.G. Kadagidze , Professor Paul Terasaki (USA), Professor G.L. Mentkevich

10:00 – 10:30 Professor Paul Terasaki "Basics in bone marrow transplantation"

10:30 – 10:50 Professor G.L. Mentkevich, N. Subbotina "Role of chimerism detection after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in children oncology"

10:50–11:10 K.N. Melkova, PhD. "Transplantation of stimulated allogeneic bone marrow in oncology"

11:10–11:30 L.Yu. Grivtsova, PhD. "Immunophenotypic peculiarities of mobilized early haematopoietic stem cells from healthy individuals"

11:30 - 11:50 Discussion

11:50-12:10 *Coffee-break*

12:10-13:30 *Afternoon session* "General questions in tumor immunology"

Chairpersons: Professor G. Janossy (London, UK), Professor N. Tupitsyn

12:10-12:30 Professor Z.G. Kadagidze "Immunomonitoring during cancer immunotherapy"

12:30-13:15 Professor G. Janossy (London, UK) "T-cell development and malignancies: recent results"

13:15-13:35 Professor. N. Tupitsyn "Possibilities of natural humoral anticancer immunity correction in Breast cancer patients"

13:35-13:45 Professor N.V. Bovin "Antiglycan antibodies in diagnostics in cancer patients"

13:45-14:30 *Dinner*

14:30-17:00 *Evening session* "Perspective studies in immunology and molecular biology of tumors"

Chairpersons:

Doctor of Sci (Med) E.V. Artamonova, Professor. S.O. Podviaznikov, Professor M.A. Frenkel

14:30-14:50 Doctor of Sci (Med) E.V. Artamonova

"Fundamental and clinical aspects of breast cancer immunophenotype"

14:50-15:10 A. Sviridov, PhD. "B-cell subpopulations in stomach cancer patients"

15:10-15:30 A. Subbotina "Immunological basis of chemotherapy sensitivity in breast cancer patients"

15:30-15:50 E. Timonina "Haematopoiesis in squamous cell head and neck cancer patients"

15:50-17:00 General discussion. Round table.