

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

*На правах рукописи*

**Хорошилов Максим Викторович**

**РОЛЬ ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТОВ В  
НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ HER2-НЕГАТИВНОГО РАКА  
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

3.2.7. Иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук

**Артамонова Елена Владимировна**

доктор биологических наук

**Заботина Татьяна Николаевна**

Москва – 2026 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Неoadьювантная химиотерапия как современный стандарт терапии опухолей молочной железы .....	12
1.2 Современный взгляд на иммунное микроокружение опухолей молочной железы .....	23
1.3 Классификация и описание основного субпопуляционного состава ИОЛ .....	26
1.4 Прогностическая и предиктивная роль инфильтрирующих опухолей лимфоцитов при различных биологических подтипах опухолей молочной железы .....	31
1.4.1 Тройной негативный рак молочной железы .....	31
1.4.2 HER2-положительный рак молочной железы .....	33
1.4.3 Люминальный HER2-негативный рак молочной железы .....	34
1.5 Методология определения инфильтрирующих опухолей лимфоцитов и заключение .....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	39
2.1 Общие критерии включения в исследование .....	39
2.2 Общие процедуры, проводимые в рамках исследования .....	40
2.3 Оценка эффективности проводимого лечения .....	41
2.4 Статистическая обработка .....	42
2.5 Иммунологические исследования методом проточной цитофлуориметрии .....	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	46
3.1 Тройной негативный рак молочной железы .....	46
3.1.1 Характеристика больных .....	46
3.1.2 Субпопуляционный состав инфильтрирующих опухолей лимфоцитов перед началом лечения .....	51

3.1.3 Влияние субпопуляционного состава на результаты неoadьювантной химиотерапии .....	53
3.2 Люминальный рак молочной железы .....	63
3.2.1 Характеристика больных .....	63
3.3 Сравнение субпопуляционного состава между тройным негативным и люминальным В HER2-негативным раком молочной железы .....	76
3.4 Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов при раке молочной железы с низкими рецепторами эстрогена (ER-low).....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
4.1 Обсуждение субпопуляционного состава инфильтрирующих опухоль лимфоцитов при тройном негативном раке молочной железы.....	84
4.2 Обсуждение субпопуляционного состава инфильтрирующих опухоль лимфоцитов при люминальном В раке молочной железы .....	87
4.3 Обсуждение субпопуляционного состава инфильтрирующих опухоль лимфоцитов при тройном негативном раке молочной железы в сравнении с люминальным В HER2-негативным раком молочной железы .....	88
ВЫВОДЫ .....	91
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости среди женского населения, оставаясь при этом глобальной медико-социальной проблемой. Ежегодно в мире регистрируется свыше 2,5 млн новых случаев РМЖ, что эквивалентно примерно четверти (25%) всех диагностированных злокачественных новообразований у женщин. Согласно данным базы GLOBOCAN в России в 2022 году было зарегистрировано 321 850 новых случаев рака у женщин, из которых 78 839 приходятся на РМЖ (24,5%). Однако российские источники за 2022 год указывают на 75 789 новых случаев [3]. Несмотря на улучшение диагностики и лечения, РМЖ остается одной из основных причин смертности. В России в 2022 году от РМЖ умерло от 16 до 18 тысяч женщин, что составляет 15,9% всех смертей от онкологии. Риск смерти от РМЖ оценивается в 1,5-1,7%, то есть 15-17 женщин из 1000 погибнут от этого заболевания в течение жизни.

Однако, благодаря совершенствованию методов лечения, включая современную химиотерапию, хирургическое вмешательство, лучевую терапию и таргетную терапию, выживаемость пациентов с раком молочной железы значительно увеличилась. Одним из таких подходов к увеличению выживаемости является неоадьювантная химиотерапия (НАХТ). Она позволяет добиться большего контроля над заболеванием и построить более персонализированную тактику лечения. В настоящее время практически все случаи рака молочной железы с размером первичной опухоли  $\geq 2$  см подвергаются именно данной тактике лечения, по крайней мере это касается тройного негативного (ТН РМЖ) и HER2-позитивного РМЖ. При местнораспространенном неоперабельном люминальном В HER2-негативном раке все еще остается опция неоадьювантной гормонотерапии, а показания для НАХТ продолжают оставаться предметом научных исследований.

Основной целью НАХТ при первично-операбельном процессе является определение чувствительности опухоли к лечению, что выражается в степени патоморфологического ответа и в зависимости от этого планирование адъювантного лечения. При местно-распространенном первично неоперабельном процессе целью является перевод опухоли в операбельное состояние. ТН РМЖ на данный момент является наиболее агрессивным текущим подтипом РМЖ, что требует особого подхода к лечению данного заболевания, и НАХТ стал определенным стандартом терапии основной ролью которой является определение патоморфоза, что в свою очередь помогает определить тактику адъювантной терапии опухоли. При первично-операбельном люминальном РМЖ вопрос применения НАХТ все еще остается дискуссионным, так как данные опухоли менее чувствительны к химиотерапии, и частота достижения полного или почти полного патоморфоза не превышает 20%, однако это не так явно транслируется на отдаленные результаты [80].

Полный патоморфологический ответ (pCR, RCB 0), достигаемый после неoadъювантной химиотерапии (НАХТ), общепризнан в качестве суррогатного маркера для точного прогнозирования исходов терапии, включая показатели безрецидивной, бессобытийной и общей выживаемости пациентов. При ТН РМЖ особенно важно достижение pCR, так как это напрямую связано с лучшими отдаленными результатами выживаемости [36].

Изучение иммунной системы и инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ) представляет особый исследовательский интерес, поскольку эти элементы играют фундаментальную роль в противоопухолевом иммунитете. В связи с этим, активный поиск предиктивных маркеров ответа на неoadъювантную химиотерапию (НАХТ) сосредоточен на выявлении ключевых факторов, которые определяют рост и дифференцировку злокачественных новообразований. Одним из первых исследований по изучению ИОЛ и иммунофенотипированию опухолевых клеток является работа 2003г. д.м.н. Артамоновой Е.В., где были сделаны выводы о том, что инфильтрация опухоли происходит в основном за счет CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, высокий уровень которых в опухоли в свою

очередь транслировался на лучшие результаты БРВ и ОВ. Стоит отметить, что данная работа была проведена еще до разделения опухоли по молекулярным подтипам. В другой более поздней работе Denkert С., запустившей интерес изучения ИОЛ, включившей 3771 пациента с РМЖ, получивших неоадьювантную химиотерапию, было показано, что высокий уровень ИОЛ ( $\geq 60\%$ ) ассоциировался с достоверным увеличением частоты полного патоморфоза - 50% против 31% в группе с низким уровнем ИОЛ, что транслировалось в улучшении как безрецидивной, так и общей выживаемости при ТН РМЖ [114]. В других работах, разных авторов, так же показана значимость определения ИОЛ, и интерес к их изучению не угасает до сих пор. Однако практически все работы сводятся к изучению общего уровня содержания ИОЛ, не определяя современные известные субпопуляции и их влияние на отдаленные результаты и, в частности, поиска предикторов ответа на НАХТ. Новые методики, такие как цитофлуориметрия позволяет получить интегративный показатель и обеспечивает тонкую количественную оценку всего состава иммунокомпетентных клеток в полученном при core-биопсии объеме опухоли.

### **Цель исследования**

Изучение субпопуляционного состава инфильтрирующих опухоль лимфоцитов при тройном негативном и люминальном HER2-негативном раннем операбельном или местнораспространенном первично-неоперабельном раке молочной железы у пациентов, получающих неоадьювантную химиотерапию.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать субпопуляционный состав ИОЛ до проведения неоадьювантной химиотерапии у пациентов с тройным негативным и люминальным HER2-негативным ранним операбельным или местнораспространенным первично-неоперабельным раком молочной железы.

2. Изучить взаимосвязь молекулярно-биологической структуры опухоли молочной железы с субпопуляционными характеристиками лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль.

3. Оценить взаимосвязь уровней субпопуляций опухоль инфильтрирующих лимфоцитов до проведенной неoadьювантной химиотерапии, с полученными результатами лечения, используя шкалу RCB.

4. Выявить значимые популяции лимфоцитов, при которых RCB 0-I достигается с наибольшей и с наименьшей частотой.

### **Научная новизна**

В рамках данной диссертационной работы впервые подробно исследован субпопуляционный состав инфильтрирующих РМЖ лимфоцитов, с использованием двойных и тройных меток включая и минорные субпопуляции, выделенные новым методом проточной цитофлуориметрии, для пациентов с первично-операбельным и местно-распространенным тройным негативным и люминальным В HER2-негативным раком молочной железы, получающих неoadьювантную химиотерапию. При ТН РМЖ выявлены значимые предикторные субпопуляции для достижения полного патоморфологического ответа, такие как CD8+CD279+ и CD8+CD28-. Для люминального В HER2-негативного рака также выявлены предикторные популяции – CD3-CD16+CD56+, CD4+CD25+, CD8+CD279+. Определено, что ТН и люминальный В HER2-негативный РМЖ имеют значимую разницу в уровне CD8+CD28+ и CD4+CD152+ лимфоцитов.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные знания о значении субпопуляционного состава опухолевого инфильтрата, в том числе и некоторых минорных субпопуляций, позволяют выделить подгруппы пациенток с максимальной и минимальной вероятностью

достижения патоморфологического ответа. Это позволит более точно персонализировать лечение как при первично-операбельном, так и при местно-распространенном РМЖ определив необходимость и целесообразность проведения химиотерапии на первом этапе. В дальнейшем полученные данные могут сыграть важную роль в интеграции иммуноонкологических препаратов на неоадьювантной этапе лечения.

### **Методология и методы исследования**

В работе использован проспективный клинический материал core-биопсии опухоли пациентов, получавших НАХТ в отделении противоопухолевой лекарственной терапии №1 отдела лекарственного лечения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

С 2018 года по 2023 год в исследование включены 179 больных раком молочной железы, ранее не получавшие лечение. В зависимости от иммунофенотипа опухоли пациенты разделены на 2 изучаемые группы: тройной негативный (90 больных) и люминальный В HER2-негативный (89 больных).

Изучение морфологического материала проведено на базе лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur производства компании Becton Dickinson (США) где определяли процентное содержание популяций лимфоцитов.

Для статистической обработки результатов выполненного исследования использовалось программное обеспечение SPSS, v.26.

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

1. Субпопуляции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ИОЛ) играют значимую роль в прогнозировании ответа на неоадьювантную химиотерапию при

раке молочной железы. Наибольшее влияние на вероятность достижения полного патоморфологического ответа оказывают CD8<sup>+</sup> - цитотоксические лимфоциты, особенно субпопуляции CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>CD279<sup>+</sup> при тройном негативном раке. Повышенные уровни этих клеток ассоциированы с высокой частотой полного патоморфологического ответа (RCB 0), что подчеркивает их значимость как эффекторных компонентов противоопухолевого иммунного ответа.

2. Т-хелперные субпопуляции (CD4<sup>+</sup>) лимфоцитов имеют влияние в зависимости от подтипа рака. Высокое содержание регуляторных лимфоцитов CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> при люминальном HER2-негативном подтипе связано с более высокой частотой полных патоморфозов, что может отражать их роль в модуляции иммунного ответа. Однако при ER-low РМЖ уровень этих клеток ниже, что свидетельствует о менее выраженном регуляторном иммунном ответе в этой группе, а также отличает его от истинно люминального.

3. CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (NKT) демонстрируют связь с прогнозом при тройном негативном раке молочной железы. Высокий уровень этой субпопуляции лимфоцитов ассоциирован с достижением полного патоморфологического ответа, что подтверждает их роль в противоопухолевом иммунитете.

4. Молекулярные подтипы рака молочной железы характеризуются различиями в содержании отдельных субпопуляций ИОЛ. Например, при люминальном HER2-негативном РМЖ наблюдается повышенное содержание CD16<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> лимфоцитов, что может отражать особенности иммунного ответа этого подтипа. При анализе местнораспространенных стадий заболевания выявлено повышенное содержание CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> лимфоцитов при люминальном HER2-негативном РМЖ и CD4<sup>+</sup>CD152<sup>+</sup> лимфоцитов при ТН РМЖ. Эти различия подчеркивают значимость субпопуляционного анализа лимфоцитов для понимания механизмов противоопухолевого иммунитета и разработки персонализированных подходов к лечению.

## **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (Медицинские науки), направлению исследований п.2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)», и паспорту научной специальности 3.2.7. Иммунология (Медицинские науки), направлению исследований п.3 «Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты».

## **Степень достоверности и апробации результатов**

Число больных, включенных в исследование, подробный анализ результатов лечения, а также использование современных методов статистической обработки полученных данных делают полученные результаты достоверными. В работе использовались данные 179 пациентов, соответствующие критериям включения и исключения.

Определение субпопуляций лимфоцитов опухоли, в частности, тех, которые взаимосвязаны с прогнозом заболевания – CD8+CD28-, CD8+CD28+, CD8+CD279+, CD4+CD25+, CD3+CD16+CD56+ – апробировано и внедрено в практику иммунологических исследований опухоли в лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий централизованного научно-клинического лабораторного отдела НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (акт внедрения от «12» декабря 2024 года).

Апробация диссертации состоялась 25.12.2024г. на совместной научной конференции отделений противоопухолевой лекарственной терапии отдела

лекарственного лечения, отделения опухолей молочной железы отдела онкомамологии НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова, лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий централизованного научно-клинического лабораторного отдела консультативно-диагностического центра, лаборатории клеточного иммунитета НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей «ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

### **Публикации по теме диссертации**

Соискатель — автор 5 публикаций. По результатам диссертационного исследования опубликовано 4 работы, в том числе 4 научные статьи в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, клинической характеристики и методов обследования больных, анализа и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 129 источников. Работа иллюстрирована 37 таблицами, 4 рисунками.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Неoadьювантная химиотерапия как современный стандарт терапии опухолей молочной железы

Ключевым аспектом современной химиотерапии РМЖ является выбор тактики лечения в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. Это позволяет разрабатывать персонализированные стратегии, направленные на повышение эффективности терапии и улучшение прогноза для пациентов. С момента развития методов молекулярной диагностики, классификация рака молочной железы обрела индивидуальность, подобно отпечатку пальца, отражающему уникальные биологические особенности. Выделены основные его подтипы, такие как люминальный А и В HER2-отрицательные, HER2-позитивный и тройной негативный рак (ТН РМЖ). Эти подтипы имеют значительные различия по биологии опухоли, клиническому течению и ответу на лечение. С недавнего времени всё большее внимание привлекает новый подтип — ER-low, который характеризуется низкой экспрессией рецепторов эстрогена (от 1% до 10%) и занимает промежуточное положение между классическими гормон-рецептор-положительными и тройными негативными опухолями. Несмотря на выделение ER-low как отдельного «субподтипа» рака молочной железы, рекомендации NCCN и ESMO пока лишь кратко касаются его лечения [40, 69]. Подчеркивается, что эффективность гормонотерапии остается ограниченной, а биологическое поведение опухолей часто напоминает ТН РМЖ, что затрудняет выбор терапии. В связи с этим предлагается индивидуальный подход, основанный на тщательном анализе соотношения рисков и пользы.

Неoadьювантная химиотерапия в настоящий момент считается стандартным методом лечения не только местнораспространенного, но и первично-операбельного рака молочной железы, и в последние годы область ее применения значительно расширилась, особенно это можно отметить при тройном негативном и HER2-позитивном фенотипе. Наряду с уменьшением размера первичной

опухоли и увеличением частоты органосохраняющих операций, целями НАХТ является достижение полного патоморфологического ответа. Степень патоморфологического ответа после проведения НАХТ, особенно при неблагоприятных подтипах, коррелирует с долгосрочными исходами лечения. Показатель полного патоморфологического ответа (pCR) на неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) является признанным суррогатным маркером, используемым для прогнозирования отдаленных результатов лечения, включая общую, безрецидивную и бессобытийную выживаемость. В рамках масштабного анализа, проведенного Р. Cortazar с соавторами, в который были включены данные 11 955 пациенток из 12 исследований по НАХТ, было установлено наиболее точное определение pCR, которое наилучшим образом коррелирует с долгосрочными исходами, а также выявлены подтипы РМЖ, для которых прогностическая ценность pCR является максимальной [80].

Результаты этого анализа продемонстрировали, что полная элиминация инвазивной опухоли как из молочной железы, так и из лимфатических узлов (то есть, статусы  $ypT0ypN0$  или  $ypT0/is\ ypN0$ ) ассоциировалась с более значимым улучшением бессобытийной выживаемости (для  $ypT0\ ypN0$ : ОР 0,44, 95% ДИ 0,39–0,51; для  $ypT0/is\ ypN0$ : ОР 0,48, 95% ДИ 0,43–0,54) и общей выживаемости (ОР, соответственно, 0,36, 95% ДИ 0,30–0,44 и 0,36, 95% ДИ 0,31–0,42) по сравнению с устранением опухоли только в молочной железе ( $ypT0/is$ ). В результате, стандартным критерием полного патоморфологического ответа в последующих исследованиях по неоадьювантной терапии стало определение  $ypT0/is\ ypN0$ . Частота достижения pCR существенно отличалась для различных молекулярных подтипов РМЖ. Для люминальных подтипов этот показатель находился в диапазоне 7,5%–16,2%; для тройного негативного рака он составлял 33,6%; для гормон-рецептор-отрицательного HER2-положительного — 50,3% при использовании трастузумаба и 30,2% без него; а для люминального В HER2-положительного — 30,9% и 18,3% соответственно. Связь между pCR и отдаленными результатами лечения оказалась наиболее сильной в подгруппах пациенток с ТН РМЖ (БСВ: ОР 0,24, 95% ДИ 0,18–0,33; ОВ: 0,16, 95% ДИ 0,11–

0,25) и у пациенток с HER2-положительными, гормон-рецептор-отрицательными опухолями, получавших трастузумаб (БСВ: ОР 0,15, 95% ДИ 0,09–0,27; ОВ: 0,08, 95% ДИ 0,03–0,22). Таким образом, пациентки, достигшие полного патоморфологического ответа ( $ypT0ypN0$  или  $ypT0/is\ ypN0$ ), закономерно демонстрируют лучшие показатели выживаемости, а прогностическая ценность данного показателя максимальна при агрессивных подтипах опухоли [4]. Эти выводы были дополнительно подтверждены последующим мета-анализом 49 исследований (18 772 пациентки, преимущественно со II–III стадией РМЖ), который также зафиксировал, что достижение pCR на фоне НАХТ коррелирует со значительным снижением рисков рецидива (ОР для БРВ 0,33, 95% ДИ 0,28–0,39,  $p < 0,001$ ) и смерти (ОР для ОВ 0,28, 95% ДИ 0,21–0,36,  $p < 0,001$ ) [79].

Тем не менее, в значительном проценте случаев не удается достичь pCR, поэтому современные исследования сосредоточены как на поиске более эффективных подходов к НАХТ, так и на терапии резидуальной болезни.

Современные режимы НАХТ берут свое начало из клинических исследований по адъювантной химиотерапии (АХТ). Исторически не было доказано преимущества неoadъювантного или адъювантного подхода назначения химиотерапии при раке молочной железы (РМЖ). В рамках работы NSABP B-18 не было установлено значимых различий в показателях безрецидивной (БРВ) и общей выживаемости (ОВ) у группы пациенток, которые получали химиотерапию (ХТ) либо до, либо после оперативного вмешательства (показатели: ОР для БРВ 0,98,  $p=0,78$ ; ОР для ОВ 0,99,  $p=0,90$ ) [10, 11]. Однако важно учитывать, что указанное исследование проводилось до момента внедрения молекулярно-генетической классификации РМЖ, а более современных клинических работ, посвященных прямому сравнению этих подходов в контексте подтипов, на данный момент не осуществлялось.

В качестве стандартных и рекомендованных схем НАХТ, применяемых по аналогии с адъювантной химиотерапией (АХТ), продолжают использоваться режимы, основанные на комбинации антрациклинов, циклофосфамида и таксанов [12, 41, 21]. Рекомендации по выбору именно таких режимов НАХТ были

сформированы на основании масштабного мета-анализа, результаты которого были опубликованы в журнале Lancet в 2012 году [32]. В этот анализ вошли данные 23 рандомизированных клинических исследований, охвативших результаты лечения 100 000 пациенток. В ходе сравнительных работ было убедительно продемонстрировано, что назначение химиотерапии (схемы CMF или AC) дает клиническое преимущество перед полным отсутствием таковой. Более того, в этом исследовании впервые было показано, что включение таксанов в терапевтическую схему повышает общую выживаемость (ОВ) на 3,2% при 8-летнем наблюдении ( $p < 0,0005$ ). Результаты подгруппового анализа подтвердили преимущество назначения таксанов (как в комбинации, так и последовательно) по сравнению с терапией только антрациклинами во всех подгруппах пациентов (ОР 0,872 для всей когорты).

Оптимальный режим таксанов был определен в исследовании J.Sparano et al. - ESOG 1199 [129], включившем 4950 пациенток после радикального хирургического лечения. Пациентки имели метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов или высокий риск рецидива при статусе N0. Пациенты получали 4 курса адъювантной ХТ по схеме 4АС 1 раз в 3 недели, затем рандомизировались на один из таксановых режимов согласно дизайну исследования (Рисунок 1). После окончания АХТ пациенткам назначалась лучевая терапия (ЛТ) и эндокринотерапия (ЭТ) по показаниям.



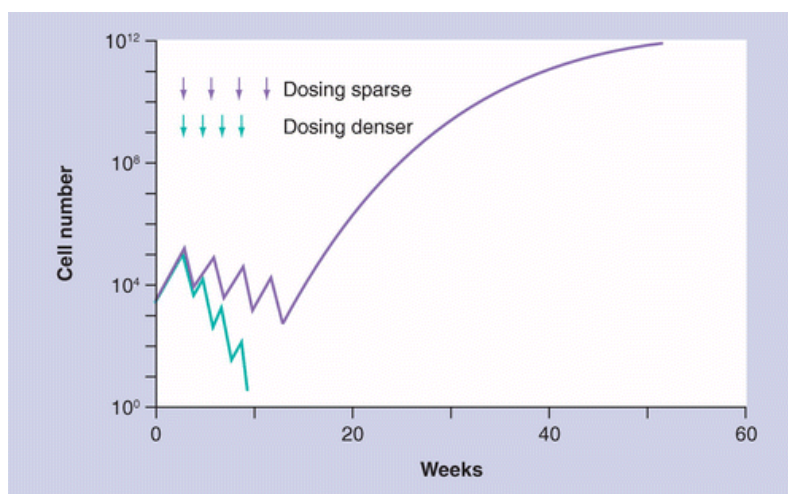
АС – Доксорубин 60 мг/м<sup>2</sup> + Циклофосфамид 600 мг/м<sup>2</sup> каждые 3 нед

**Рисунок 1** – Исследуемые режимы таксанов в исследовании ESOG 1199

По результатам исследования было выявлено, что назначение паклитаксела в еженедельном режиме демонстрирует статистически значимое увеличение ВП и ОВ по сравнению с другими режимами. В то же время доцетаксел в режиме 1 раз в три недели демонстрирует статистически достоверное увеличение ВП, но не ОВ по сравнению с группой контроля получавшей паклитаксел раз в три недели.

Благодаря результатам данного исследования была составлена оптимальная тактика назначения таксанов при последовательном применении с антрациклинами – это паклитаксел 80 мг/м<sup>2</sup> в еженедельном режиме, либо доцетаксел 100 мг/м<sup>2</sup> 1 раз в 3 недели. *Однако стоит отметить, что в рекомендациях Минздрава России рекомендовано использование доцетаксела в дозе 75 мг/м<sup>2</sup> 1 раз в 3 недели, так как дозовый режим 100 мг/м<sup>2</sup> сопряжен с высокой токсичностью, при этом эффективность АХТ доцетакселом в дозе 75 мг/м<sup>2</sup> в клинических исследованиях не изучена.*

Концепция дозоинтенсивной химиотерапии (dose dense) довольно долго прокладывала свой путь в клиническую практику, особенно на территории РФ. Еще в 70-х годах XX столетия была сформулирована гипотеза, что скорость роста опухоли пропорциональна скорости ее сокращения при ответе на лекарственную терапию (Рисунок 2). Отсюда и пошло развитие данного направления.



**Рисунок 2** – Обоснование применения дозоуплотненной химиотерапии Morris, McArthur, Hudis & Norton

Необходимость проведения dose dense режимов в адьювантной терапии РМЖ доказана результатами нескольких проведенных мета-анализов. Например, в мета-анализ Vonilla et al. 2010 года были включены 10 рандомизированных исследований III фазы [39]. Исследования делились на две категории: с использованием одинаковых режимов ХТ, но с разным интервалом введения как в адьювантном, так и в неоадьювантном режиме. В 3 исследованиях (3337 пациенток) использовались дозоинтенсивные антрациклин-таксан содержащие режимы ХТ. Было показано, что дозоинтенсивные режимы имели преимущество как в ВБП ( $p=0,005$ ), так и в ОБ ( $p=0,03$ ). По данным подгруппового анализа, наибольший выигрыш в ВБП наблюдался у пациенток с отрицательной экспрессией гормональных рецепторов опухоли ( $HR=0,71$ ). Похожие результаты были и в исследовании Fausto Petrelli et al 2015 года с включением 8 исследований и 17188 пациентов по изучению режимов адьювантной химиотерапии [11].

В 2017 году на SABCS (San Antonio Breast Cancer Symposium) был опубликован мета-анализ совместной группы исследователей раннего рака молочной железы, в который было включено более 21000 пациенток по общим данным 16 исследований адьювантной ХТ раннего РМЖ [7]. 7 исследований в которых использовались одинаковые режимы ХТ были выделены для изучения данных о применении дозоинтенсивной ХТ против стандартных режимов. Были получены следующие данные: применение дозоинтенсивной химиотерапии позволило снизить риск рецидива на 17% и снижение риска смерти от РМЖ на 14%. Интенсификация дозового режима снижало риск рецидива на 18% у пациентов с отрицательным уровнем рецепторов эстрогена и на 14% у пациентов с положительным уровнем рецепторов эстрогена. Возраст, статус HER2, статус поражения л/у, размер или степень злокачественности опухоли достоверно не влияли на полученные результаты.

По результатам исследования, опубликованного в The Lancet в 2019 году, показано, что дозоинтенсивная химиотерапия при раннем РМЖ более эффективна, чем стандартные схемы ХТ. В метаанализе данных 37 298 женщин было установлено, что дозоинтенсивная терапия снижает 10-летний риск

рецидива до 28,0% по сравнению с 31,4% при стандартной терапии, снижает 10-летнюю смертность от РМЖ до 18,9% по сравнению с 21,3% и общую смертность до 22,1% по сравнению с 24,8%. Также отмечено, что БРВ была ниже в группе дозоинтенсивной ХТ (4,1% против 4,6%). Улучшение показателей было одинаково выражено как при позитивных, так и при негативных рецепторах эстрогена, без увеличения смертности от других причин. Таким образом, увеличение интенсивности химиотерапии улучшило долгосрочные результаты лечения раннего РМЖ. Очень важно, что снижение рисков пропорционально было одинаковым и достоверным как у пациентов с гормон-рецептор отрицательных, так и при гормон-рецептор положительных [55].

Ещё один более поздний мета-анализ, посвященный dose-dense режимам в неoadъювантной химиотерапии, был опубликован Ding, Yuqin et al. в 2020 году и включал в себя 10 рандомизированных клинических исследований с 3724 пациентами с РМЖ [38]. Группы пациентов, получавших дозоинтенсивные режимы ХТ и стандартные, были представлены в равной степени - 1857 и 1867, соответственно. Оказалось, что в группе получавших dose-dense режимы химиотерапии частота полных патоморфологических ответов (pCR) была выше на 18%.

Другим выводом подгруппового анализа стало то, что у пациентов без экспрессии гормональных рецепторов (эстрогена и прогестерона) частота pCR была наибольшей и составила 35% по сравнению с контрольной группой. Риск рецидива в группе дозоинтенсивных режимов был ниже на 10%, а риск смерти на 8%, однако различия оказались статистически не достоверны ( $p=0,095$  и  $p=0,160$  соответственно), возможно из-за меньшего числа пациентов по сравнению с предыдущим мета-анализом.

Активно изучаются препараты платины, PARP-ингибиторы, CDK 4/6-ингибиторы в неoadъювантной и адъювантной терапии раннего рака молочной железы.

PARP-ингибиторы, такие как олапариб и талазопариб, уже являются стандартом и активно используются в клинической практике для лечения рака

молочной железы у пациентов с мутациями генов BRCA1/2. Эти препараты блокируют фермент PARP, участвующий в репарации ДНК, что приводит к гибели опухолевых клеток с дефицитом гомологичных рекомбинаций (HRR). Исследования OlympiAD [74] и EMBRACA [107] показали, что использование PARP-ингибиторов увеличивает ВВП и достоверно снижает риск прогрессирования у пациентов с метастатическим BRCA-ассоциированным раком молочной железы, после чего началось их изучение при раннем РМЖ.

На данный момент PARP-ингибиторы уже применяются в адъювантной терапии для уменьшения риска рецидива у пациентов с ТН РМЖ и наличием резидуальной опухоли после НАХТ. В исследовании OlympiA было показано, что олапариб улучшает выживаемость без инвазивного заболевания (ОР = 0,58) и общую выживаемость (ОР = 0,68, 95% ДИ 0,50–0,91) и входит в международный и национальные клинические рекомендации [75].

CDK 4/6-ингибиторы, такие как палбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб, используются в лечении люминального рака молочной железы. Эти препараты блокируют циклин-зависимые киназы 4 и 6 (CDK4/6), которые играют ключевую роль в регуляции клеточного цикла. CDK 4/6-ингибиторы эффективны в комбинации с эндокринной терапией, увеличивая время до прогрессирования заболевания и улучшая общую выживаемость.

В исследовании PALOMA-2 пациенты с гормонозависимым HER2-отрицательным раком молочной железы, получавшие палбоциклиб в комбинации с летрозолом, показали значительное увеличение ВВП (24,8 месяцев против 14,5 месяцев при монотерапии летрозолом; ОР = 0,58, 95% ДИ 0,46–0,72) [77]. В исследовании MONALEESA-7, рибоциклиб в комбинации с эндокринной терапией улучшил общую выживаемость по сравнению с плацебо 58,7 против 48 месяцев соответственно (ОР = 0,76, 95% ДИ 0,61–0,96) [126]. Абемациклиб в исследовании MONARCH 2 также показал значительное улучшение ВВП (16,4 месяца против 9,3 месяцев при монотерапии фулвестрантом; ОР = 0,55, 95% ДИ 0,45–0,68) и улучшение общей выживаемости 45,8 месяцев против 37,2 месяца (ОР = 0,78, 95% ДИ 0,64–0,96) [8, 109].

Карбоплатин нашел применение в лечении трижды негативного рака молочной железы (ТН РМЖ), входя в схемы как неoadъювантной химиотерапии (с целью повышения частоты pCR), так и адъювантной терапии (для минимизации риска рецидива).

Ключевым исследованием, посвященным оценке роли карбоплатина в неoadъювантном режиме, стало рандомизированное исследование BrighTNess [9]. В рамках этой работы пациентки с ТН РМЖ были рандомизированы на три лечебные когорты: 1) стандартный режим с паклитакселом, 2) паклитаксел в комбинации с карбоплатином и 3) паклитаксел и карбоплатин с добавлением ингибитора PARP — велипариба.

Полученные результаты продемонстрировали, что включение карбоплатина существенно повышает частоту достижения pCR: 31% в группе стандартной терапии паклитакселом, 58% в группе с паклитакселом и карбоплатином и 53% в группе, где дополнительно применялся велипариб. Статистически значимое увеличение частоты pCR при добавлении карбоплатина к паклитакселу по сравнению с контрольной группой было подтверждено ( $p < 0,001$ ). В то же время, добавление велипариба к комбинации паклитаксел + карбоплатин не обеспечило дополнительного существенного увеличения частоты pCR.

Исследование GeparSixto является еще одной работой, в которой оценивалось включение карбоплатина в схемы неoadъювантной химиотерапии для пациенток с трижды негативным раком молочной железы. В нем участницы получали стандартную антрациклин-таксан содержащую НАХТ, дополненную карбоплатином. Анализ полученных данных выявил, что частота достижения полного патоморфологического ответа (pCR) в исследуемой группе с карбоплатином достигла 47,3%. Этот показатель оказался выше, чем в группе без карбоплатина, где pCR составил 36,9%. При этом статистическая оценка данного различия показала ОР 1,33 (95% ДИ 0,96–1,85;  $p=0,107$ ).

Дальнейший анализ выявил что дефицит гомологичной рекомбинации (HRD) является независимым предиктором pCR (ОР 2,60, 95% ДИ 1,26-5,37,  $p = 0,008$ ). Добавление карбоплатина к терапии значительно увеличило частоту pCR с

33,9% до 63,5% у опухолей с дефицитом HR ( $p = 0,001$ ), но лишь незначительно у опухолей без дефицита HR (с 20,0% до 29,6%,  $p = 0,540$ ). Безрецидивная выживаемость также улучшилась при добавлении карбоплатина у пациентов с высоким HRD-индексом без *tmBRCA* (OR 3,69, 1,46-9,37,  $p = 0,005$ ) Эффект карбоплатина был особенно выражен у пациентов с мутациями *BRCA1/2*, где частота *pCR* достигала 66% [104].

Однако ряд исследований, в том числе мета-анализов показали, что карбоплатин не оказывает благоприятного эффекта на достижение *pCR*, в связи с чем применение карбоплатина в НАХТ ТН РМЖ долгое время было не рекомендовано в рутинной клинической практике в международных рекомендациях NCCN и ESMO. Например, в мета-анализе, проведенном на основе пяти исследований с участием 363 пациентов, показал, что добавление карбоплатина к неoadъювантной химиотерапии у пациентов с мутациями *BRCA* незначительно увеличило частоту *pCR* с 33,9% до 43,4%. Однако эта разница не была статистически значимой (OR: 1,340, 95% ДИ: 0,677–2,653,  $p = 0,400$ ). Подгрупповой анализ также показал, что платиновые препараты не увеличивают *pCR* в группах ТН РМЖ (OR: 1,028, 95% ДИ: 0,779–1,356,  $p = 0,846$ ) и *HER2*-отрицательного РМЖ (OR: 0,935, 95% ДИ: 0,716–1,221,  $p = 0,622$ ) [89]. В рекомендациях RUSSCO 2023 года режимы с добавлением производных платины могут быть использованы при ТН РМЖ в НАХТ.

Останавливаться на достигнутом, конечно, нельзя, поэтому перспективными на текущий момент остаются работы по внедрению иммунотерапии (ИТ) для лечения пациентов с РМЖ. Для метастатического ТН РМЖ с положительной экспрессией *PD-L1* назначение атезолизумаба в комбинации с наб-паклитакселом или пембролизумаба с различными режимами химиотерапии стало стандартом 1й линии лечения, опираясь на результаты исследований *Impassion131* [93] и *Keynote-355* [84]. Оценка эффективности включения иммунотерапии в стандартные режимы неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) стала предметом последующего изучения в контексте раннего и местно-распространенного рака молочной железы [78]. Ключевое

исследование Keynote-522 было посвящено анализу результатов применения пембролизумаба (ингибитора PD-1) в сочетании со стандартной схемой химиотерапии, которая включала 4 курса AC/EC (1 раз в 3 недели) с последующими 12 еженедельными введениями паклитаксела и карбоплатина. По данным первого промежуточного анализа, охватившего 602 пациентки, уровень полного патоморфологического ответа (pCR) в группе, получавшей пембролизумаб + ХТ, достиг 64,8%. Это значительно превзошло показатель в группе плацебо + ХТ, где pCR составил 51,2% (абсолютная разница составила 13,6%;  $p < 0,001$ ). При медиане наблюдения в 39,1 месяца, показатели 3-летней бессобытийной выживаемости (БРВ) также были выше в группе пембролизумаба (84,5%) в сравнении с группой плацебо (76,8%) (ОР 0,63;  $p < 0,001$ ). Было также установлено, что достигнутое преимущество не коррелировало с уровнем экспрессии PD-L1 [83].

Постнеоадьювантная терапия ТН и HER2+ РМЖ, позволяющая улучшить отдаленные результаты при наличии резидуальной опухоли, уже стала повсеместным стандартом. По данным исследования Create X где были рандомизированы 910 пациентов с HER2-негативным РМЖ с наличием резидуальной опухоли после стандартной антрациклин-таксан содержащей НАХТ для получения послеоперационного лечения с капецитабином или без него (контрольная группа). Основной конечной точкой была БРВ, а вторичной общая выживаемость (ОВ). При промежуточном анализе были достигнуты цели основной конечной точки, и испытание было завершено досрочно. Анализ показал, что БРВ была выше в группе капецитабина по сравнению с контрольной группой (74,1% против 67,6% пациентов были живы и без рецидива или второго рака через 5 лет; ОР 0,70; 95% ДИ, 0,53-0,92;  $p=0,01$ ). Общая выживаемость (OS) также была выше в группе капецитабина (89,2% против 83,6%; ОР 0,59; 95% ДИ, 0,39-0,90;  $p=0,01$ ). Среди пациентов с ТН РМЖ, частота БРВ составила 69,8% в группе капецитабина против 56,1% в контрольной группе (ОР 0,58; 95% ДИ, 0,39-0,87), а ОВ составила 78,8% против 70,3% (ОР 0,52; 95% ДИ, 0,30-0,90) [10].

## 1.2 Современный взгляд на иммунное микроокружение опухолей молочной железы

Рак молочной железы относится к опухолям с низкой иммуногенностью и, следовательно, потенциально скромной эффективностью ИТ. Однако, недавние исследования показали наличие определенных подтипов с богатым иммунным микроокружением [22]. В норме взаимодействие между эпителиальными и стромальными клетками необходимо для развития и дифференцировки ткани молочной железы. Но в процессе онкогенеза посредством паракринной сигнализации изменяется состав микроокружения, что способствует эпителиально-мезенхимальному переходу и инвазии опухолевых клеток, что является ключевым фактором в прогрессировании заболевания и появлении отдаленных метастазов [64]. Три основных подтипа опухолевого микроокружения были определены для различных злокачественных опухолей: иммунно-пустые (“холодные” опухоли, в значительной степени лишенные лимфоцитов), иммунно-исключенные (“промежуточные” опухоли, лимфоциты присутствуют только в перитуморальной строме) и иммунно-инфильтрированные (“горячие” опухоли) [24, 26]. Концептуально, каждая из этих категорий опухолевого микроокружения отражает специфическое взаимодействие между фенотипом опухоли и иммунной системой, которое определяет эффективность, как химиотерапии, так и ИТ [125]. Однако в каждом подтипе опухолевого микроокружения существует гетерогенность, обусловленная не только наличием различных клонов опухолевых клеток, но и составом опухолевой стромы в разных участках опухоли, что добавляет неопределенности к воспроизводимости текущей классификации “холодных”, “горячих” и “промежуточных” подтипов. Кроме того, не существует валидированных критериев для определения этих подтипов с использованием морфологии, иммуногистохимии (ИГХ), транскриптомики, либо их комбинации, что не позволяет использовать представленную классификацию в клинических исследованиях и рутинной практике.

Стромальные клетки или строма опухоли – это часть опухолевого микроокружения, которая изменяется в течение времени и с прогрессированием опухоли. Она представлена: фибробластами, ИОЛ, эндотелиальными клетками, инфильтрирующими воспалительными клетками, сигнальными клетками, адипоцитами и компонентами внеклеточного матрикса [50]. Взаимодействия между стромой и опухолевыми клетками, наряду с лежащими в основе генетическими альтерациями опухолевых клеток, определяют характеристики роста, морфологию и инвазивность опухоли [6].

Наиболее распространенным типом клеток в опухолевой строме являются опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) [67]. Несколько исследований показали, что ОАФ имеют отличные от фибробластов в соседних нормальных тканях молочной железы экспрессионные профили. Например, они демонстрируют повышенную экспрессию генов, связанных с развитием и морфогенезом, таких как NOTCH2 [29, 30]. Кроме того, двунаправленный сигнальный путь между ОАФ и опухолевыми клетками предполагает, что ОАФ также могут влиять на профиль транскрипции клеток рака молочной железы [67, 62]. Продуцируемые ОАФ металлопротеиназы способствуют инвазии опухолевых клеток, в то время как кавеолин-1 и подопланин ассоциированы со снижением частоты метастазирования в лимфатические узлы [67]. Аналогично, было показано, что потеря кавеолина-1 является независимым предиктором поражения лимфатических узлов, раннего рецидива опухоли и неблагоприятного клинического исхода при РМЖ [94].

Дендритные клетки (ДК) выполняют критическую функцию в активации врожденного иммунного ответа против опухоли, поскольку обладают уникальной способностью осуществлять перекрестную презентацию антигенов к CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитам, иницируя, таким образом, атаку этих лимфоцитов на злокачественные клетки [46]. Фенотип ДК (будь то толерогенный или иммуносупрессивный) напрямую зависит от состава микроокружения опухоли. В опухолевой строме часто наблюдается высокая концентрация незрелых ДК. Эти клетки обладают пониженной эффективностью в стимуляции

противоопухолевого иммунитета, а также синтезируют проангиогенные факторы, что активно способствует прогрессированию новообразования. Известно, что это проангиогенное действие снижается при достижении ДК зрелого состояния [35, 102, 112]. Действительно, было продемонстрировано, что наличие зрелых ДК в первичных очагах ассоциировано с меньшей частотой развития метастазов и, соответственно, более благоприятным клиническим прогнозом. Стоит также отметить, что ряд цитокинов МОО, например, интерлейкин-10, простагландин E2 и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), способны модулировать созревание ДК, направляя его в сторону регуляторного фенотипа, который способен подавлять пролиферацию Т-клеток. Следовательно, индукция созревания ДК — например, путем активации через Toll-подобные рецепторы или CD40 с помощью молекулярных триггеров — представляет собой перспективную терапевтическую стратегию в онкологической иммунотерапии, так как она не только потенцирует иммунные реакции организма, но и ингибирует ангиогенез [57, 60, 66, 115].

В то же время опухоль-ассоциированные макрофаги (ОАМ) образуют основную клеточную популяцию опухолевого микроокружения рака молочной железы и демонстрируют характерный фенотип, ориентированный на стимулирование роста опухоли и ангиогенеза, ремоделирование тканей и поддержание адаптивного иммунитета [127]. Они происходят из моноцитов крови, рекрутируемых в месте опухоли с помощью факторов, секретируемых неопластическими и стромальными клетками, таких как хемокин и лиганд 2. ОАМ продуцируют множество факторов, способствующих развитию опухоли, таких как VEGF, цитокины и ферменты, которые поддерживают инвазию, ангиогенез и метастазирование. В целом макрофаги можно классифицировать как классически (M1) или альтернативно (M2) активированные. Во время нормальных иммунологических реакций большинство макрофагов имеют фенотип M1 и участвуют в активации Th1. В свою очередь фенотип M2 определяет активацию Th2 и посредством секреции IL-10, CCL2, CCL17, CCL22 и трансформирующего фактора роста (TGF)- $\beta$  стимулирует неоангиогенез, инвазию и миграцию опухолевых клеток. Так хемокин CCL22 привлекает подмножество Т-клеток,

лишенных цитотоксических функций, таких как Treg [1, 34, 61]. Многочисленные исследования связывают высокие уровни ОАМ с худшим прогнозом при раке молочной железы, таким образом, стратегии, направленные на перепрограммирование или истощение ОАМ, представляют собой одно из современных перспективных направлений системной терапии опухолей [45, 96].

Внеклеточный матрикс (ВМ) — это сложная сеть белков, которая окружает и стабилизирует клетки. Он состоит из трех основных типов белков: структурных белков (например, коллагена/эластина), гликопротеинов (например, фибронектина) и протеогликанов (например, хондроитинсульфата) [103]. Хотя первоначально ВМ рассматривался как стабильная структура, обеспечивающая исключительно архитектуру ткани, новые исследования показывают, что ВМ удивительно динамичен и представляет собой ключевого игрока в клеточных процессах, таких как рост, пролиферация и миграция клеток [17, 65].

Одной из важнейших составляющих опухолевого микроокружения являются иммунные инфильтраты, или опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ИОЛ), которые состоят в основном из Т-клеток [114, 121]. Состав иммунных инфильтратов, их влияние на эффективность НАХТ и прогноз находятся в фокусе современных исследований.

### **1.3 Классификация и описание основного субпопуляционного состава ИОЛ**

У ИОЛ множество субпопуляций, что объясняет сложность их изучения и тот факт, что они могут как подавлять рост опухоли, так и способствовать прогрессированию путем создания новых иммунорезистентных клонов или формирования в микроокружении опухоли условий, способствующих ее росту. Популяции ИОЛ включают в себя преимущественно Т-лимфоциты и В-лимфоциты, а также натуральные киллерные клетки (NK) [81]. Как следствие, с развитием иммуногистохимии в качестве основного метода исследования ИОЛ растет изученное число субпопуляций.

Биомаркером Т-лимфоцитов является CD3, который экспрессируется почти на всех Т-лимфоцитах. В соответствии с поверхностными маркерами Т-лимфоциты в основном включают следующие основные подтипы: CD8<sup>+</sup> - цитотоксические Т-лимфоциты, CD4<sup>+</sup> - Т-хелперные лимфоциты, CD45RO<sup>+</sup> - Т-клетки памяти, регуляторные клетки FOXP3<sup>+</sup> и другие. CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты особенно известны своей цитолитической активностью в отношении опухолевых клеток [14]. CD4<sup>+</sup> Т-хелперные клетки 2 типа, включая FOXP3 (регуляторная клетка) подавляют противоопухолевый иммунный ответ. Это приводит к росту опухоли в организме и развитию иммунной толерантности [2]. До конца неясно, какая роль в этом процессе отведена НК-клеткам и В-лимфоцитам [116].

CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты относят к числу наиболее изученных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов. Их основная функция реализуется преимущественно двумя путями: цитолизом клеток-мишеней и секрецией цитокинов/интерлейкинов. Стимуляция CD8<sup>+</sup>-клеток к "атаке" происходит посредством взаимодействия их Т-клеточного рецептора с пептидом, который представлен на молекуле МНС I клетки-мишени. После активации лимфоциты высвобождают перфорин — молекулу, ответственную за формирование пор (каналов) в плазматической мембране целевой клетки, что непосредственно ведет к ее лизису. Дополнительно CD8<sup>+</sup>-клетки секретируют гранзимы (сериновые эстеразы), которые проникают через эти каналы и инициируют процесс апоптоза [46]

CD8<sup>+</sup> лимфоциты признаны ключевым звеном специфического клеточного адаптивного иммунитета против опухолей. Данные клинических исследований убедительно демонстрируют их прямую корреляцию с показателями выживаемости при ряде злокачественных новообразований, включая колоректальный рак [124] и рак яичников [56]. Применительно к раку молочной железы (РМЖ), было показано, что значительная инфильтрация CD8<sup>+</sup>-лимфоцитами выступает в качестве независимого прогностического фактора, указывающего на благоприятный клинический исход [58, 117]. Тем не менее, до

недавнего времени оставался открытым вопрос, представляют ли CD8<sup>+</sup>-клетки собой тот ключевой компонент ИОЛ, который напрямую ассоциирован с непосредственным терапевтическим ответом на химиотерапию.

В исследовании Seo, A.N et al, 2013 показано, что инфильтрация CD8<sup>+</sup> была независимым прогностическим фактором для pCR у пациентов с раком молочной железы, получавших химиотерапию на основе антрациклинов или их комбинации с таксанами [122]. West et al (2011) сообщили, что адъювантная химиотерапия на основе антрациклинов была более эффективна у пациентов с раком молочной железы при более высокой инфильтрации опухоли CD8<sup>+</sup> ИОЛ [119]. Mattarollo et al (2011) обнаружили, что терапевтическая эффективность лечения доксорубицином сильно зависела от продукции CD8<sup>+</sup> и IFN- $\gamma$  в экспериментальной модели рака молочной железы у лабораторных мышей. Более того, высокие уровни экспрессии CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$  и IFN- $\gamma$  в образцах рака молочной железы человека до химиотерапии антрациклинами также коррелировала с клиническим ответом (Mattarollo et al, 2011) [88]. В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что CD8<sup>+</sup> являются основным компонентом ИОЛ, связанным с ответом на химиотерапию на основе антрациклинов.

Иммунный ответ, направленный против опухоли, включает как гуморальное звено (представленное В-лимфоцитами), так и клеточное звено (за которое ответственны Т-лимфоциты). Т-клетки играют ключевую роль в контроле пролиферации новообразования, в то время как данные о противоопухолевой активности В-лимфоцитов остаются противоречивыми. Известно, что цитотоксические Т-лимфоциты осуществляют инфильтрацию опухолевой ткани на одном из завершающих шагов цикла противоопухолевого иммунитета.

Состав иммунных инфильтратов был детально проанализирован в исследовании С. Gu-Trantein и соавт. [24]. Авторы установили, что Т-лимфоциты формируют приблизительно 75% от общего числа всех опухолеинфильтрирующих клеток (ОИК), В-лимфоциты составляют менее 20%, а доля естественных киллеров не превышает 5%.

Клетки, обладающие доказанным противоопухолевым потенциалом, включают CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты, Т-хелперы 1-го типа (CD4<sup>+</sup>), а также естественные киллеры (NK-клетки), дендритные клетки и M1-макрофаги [44].

В последнее время интенсивно изучается роль В-лимфоцитов в реализации противоопухолевого иммунного ответа, что так и остается одной из «загадок» и требует более детального исследования. Также ведутся работы по изучению роли NK- и NKT- Т-клеток в активации противоопухолевого иммунитета. Данные клетки делятся на 2 типа, которые могут оказывать разную противоопухолевую активность, в частности NKT I типа (iNKT – инвариантные) обладают более выраженной противоопухолевой активностью, в то время как NKT-клетки II типа, наоборот, участвуют в стимуляции опухолевого роста [43, 37, 108]. Metelitsa et al. и Schneiders et al. в своих работах показали, что повышенный уровень iNKT до начала терапии может оказывать предиктивное и прогностическое значение, однако исследование проводилось на материале из периферической крови [64, 28]. NKT-клетки исполняют регуляторную роль при разных аутоиммунных заболеваниях, хроническом воспалении, а также при опухолевом процессе [101].

Т-лимфоциты, входящие в состав ИОЛ, состоят из основных 2х субпопуляций: CD8<sup>+</sup> Т-цитотоксические лимфоциты, способные распознавать антигены опухоли, находящиеся на поверхности главного комплекса гистосовместимости I класса (MHC I) и осуществлять непосредственный лизис клеток-мишеней. Во многих исследованиях показано, что инфильтрация опухоли CD8<sup>+</sup> Т-цитотоксическими лимфоцитами связана с улучшением выживаемости [12, 14, 25, 117]. Однако данные клетки до начала химиотерапии находятся в «спящем» состоянии и неспособны инициировать свою противоопухолевую активность. Проведение химиотерапии приводит к гибели опухолевых клеток и последующему захвату опухолевых антигенов ДК и представлению их Т-лимфоцитам, что индуцирует развитие противоопухолевого иммунного ответа [59]. В ряде исследований было показано, что при раке молочной железы высокий

уровень инфильтрации опухоли цитотоксическими CD8<sup>+</sup> Т-клетками был связан с улучшением общей выживаемости и частоты ответов на терапию.

Стоит отметить, что CD8<sup>+</sup> клетки могут терять способность реализовывать иммунный противоопухолевый ответ без поддержки CD4<sup>+</sup> Т-хелперами [72, 19]. CD4<sup>+</sup> Т-хелперы после взаимодействия с антигенами опухоли, презентруемыми дендритными клетками в составе МНС II, определяют активацию как клеточного, реализуемого CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, так и гуморального иммунного ответа. Можно выделить следующие субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток: Th1, Th2 и Th17. Th1-лимфоциты продуцируют интерферон- $\gamma$ , их наличие связано с благоприятными клиническими исходами, в то время как Th2-клетки обуславливают ослабление противоопухолевого ответа. Th17-клетки продуцируют про-воспалительные цитокины, их влияние на развитие противоопухолевого иммунного ответа различно в зависимости от состава опухолевого микроокружения. Наличие фолликулярных хелперных клеток (Tfh) - новейшей субпопуляции CD4<sup>+</sup>, ассоциировалось с благоприятными исходами как при адьювантной, так и при неoadьювантной терапии.

Роль регуляторных Т-клеток CD4<sup>+</sup> (Treg) в реализации противоопухолевого иммунитета окончательно не ясна. По данным различных исследований наличие этих клеток в опухолевом микроокружении может быть ассоциировано как с благоприятным, так и с неблагоприятным исходом.

Повышенная экспрессия FoxP3 транскрипторного фактора на Т-лимфоцитах характеризуется ингибированием промоторной части гена провоспалительных цитокинов. Взаимодействие нуклеарного фактора RANK и его лиганда, продуцируемого FoxP3 лимфоцитами, может способствовать метастазированию, как было показано на экспериментальных моделях РМЖ (37 Ст), а также наличие маркера Th2- CD4<sup>+</sup> лимфоцитов с экспрессией FOXP3<sup>+</sup> в опухоли было связано с худшим прогнозом. При оценке более 200 случаев рака молочной железы, содержащими более 15 клеток FOXP3<sup>+</sup>, наблюдалось снижение БРВ ( $p = 0,04$ , ОР 1,58, 95 % ДИ 1,01-2,47) и общей выживаемости ( $p = 0,07$ , ОР 1,62, 95 % ДИ 0,96-2,74) [47, 97].

В первоначальных исследованиях стромальные и внутриопухолевые лимфоциты оценивались отдельно. Внутриопухолевые ИОЛ – это лимфоциты в гнезде опухоли, имеющие межклеточный контакт без промежуточной стромы и непосредственно взаимодействующие с клетками карциномы, в то время как стромальные ИОЛ расположены рассеянно в строме и не контактируют напрямую с опухолевыми клетками. Опираясь на знания о подтипах опухолевого микроокружения, была сформулирована гипотеза, что внутриопухолевые лимфоциты могут играть ключевую роль в реализации противоопухолевого иммунного ответа. Однако, данная гипотеза не нашла подтверждения в ретроспективных исследованиях. Ruan et al. и соавторы проанализировали 166 образцов биопсийного материала и показали, что обе популяции ИОЛ являются независимыми предиктивными факторами достижения pCR ( $p=0,0001$  для стромальных ИОЛ,  $p=0,001$  для внутриопухолевых) [90]. Несомненным преимуществом стромальных ИОЛ в качестве прогностического и предиктивного маркера является более высокая воспроизводимость методики, обусловленная тем, что внутриопухолевые ИОЛ обычно определяются в меньшем количестве, они более гетерогенны и труднее визуализируются на предметном стекле (без использования метода ИГХ).

#### **1.4 Прогностическая и предиктивная роль инфильтрирующих опухоль лимфоцитов при различных биологических подтипах опухолей молочной железы**

##### **1.4.1 Тройной негативный рак молочной железы**

ТН РМЖ характеризуется наибольшей мутационной нагрузкой и иммуногенностью среди всех подтипов рака молочной железы, что определяет важнейшую роль ИОЛ в реализации ответа на противоопухолевое лечение [73]. В ретроспективном анализе, включившем 13100 пациентов, продемонстрирована достоверная ассоциация высокого уровня ИОЛ с отсутствием экспрессии РЭ и РП

( $p=0,001$ ), высокой степенью злокачественности ( $p<0,001$ ) [80]. Высокий уровень ИОЛ является важнейшим прогностическим фактором уже при ранних стадиях ТН РМЖ. Так, в исследовании, опубликованном Kos и соавторами, было показано, что уровень  $\text{ИОЛ} \geq 75\%$  ассоциирован с впечатляющими отдаленными результатами после радикального лечения даже при отсутствии системной терапии - 15ти-летняя общая выживаемость составила 93% против 59% в подгруппе с  $\text{ИОЛ} < 30\%$  в популяции пациенток с первично-операбельным ТН РМЖ подавляющая часть которых (98%) имела размер опухоли менее 5 см [87]. Кроме того, высокий уровень ИОЛ является важнейшим предиктором эффективности системной терапии ТН РМЖ. В крупном мета-анализе, включившем данные 6 проспективных клинических исследований и 3771 пациента с РМЖ, получивших неoadъювантную химиотерапию, было показано, что высокий уровень  $\text{ИОЛ} \geq 60\%$  ассоциировался с достоверным увеличением частоты полного патоморфоза - 50% против 31% в группе с низким уровнем ИОЛ, что транслировалось в улучшение как безрецидивной, так и общей выживаемости при ТН РМЖ [114]. По результатам однофакторного регрессионного анализа увеличение ИОЛ на каждые 10% достоверно снижает отношение рисков рецидива инвазивного рака на 13% и смерти на 17% [90].

Ингибиторы контрольных точек иммунной системы произвели революцию в лечении злокачественных опухолей и постепенно внедряются в стандарты лечения раннего тройного негативного рака молочной железы [84, 70]. В исследовании II фазы GeparNuevo, посвященном изучению эффективности стандартной неoadъювантной химиотерапии +/- дурвалумаба (анти-PD-L1) при раннем ТН РМЖ продемонстрировано, что высокий уровень ИОЛ наравне с PD-L1 ассоциированы с достижением полного патоморфологического ответа в обеих группах пациентов [5].

Следует отметить, что высокий уровень ИОЛ при редких гистологических вариантах ТН РМЖ имеет несколько иное прогностическое значение. Например, аденоидно-кистозная карцинома характеризуется низким значением ИОЛ, но

прогноз этих пациентов значительно лучше, чем при карциноме неспецифического типа [63].

Помимо общего содержания ИОЛ в опухоли до начала лечения, важное значение имеет также иммунный инфильтрат и его субпопуляционный состав после проведенной НАХТ. Было показано, что высокий уровень CD8(+)-ИОЛ и высокое соотношение CD8+/FOXP3+ в остаточных опухолях после неoadьювантной химиотерапии могут точно предсказать улучшение прогноза у пациентов с ТН РМЖ [112]. Аналогичным образом, соотношение CD8+/FOXP3+ может быть полезным биомаркером для прогнозирования ответа на неoadьювантную терапию при агрессивных подтипах рака молочной железы, таких как ТН РМЖ и HER2+ [37].

#### **1.4.2 HER2-положительный рак молочной железы**

Несмотря на то, что в наши задачи оценка ИОЛ при HER2-положительном РМЖ не входила мы кратко включим информацию по данному подтипу в наш обзор, так как в самых ранних работах не было деления РМЖ на подтипы, поэтому частично выявленные иммунологические закономерности могли относиться именно к опухолям с гиперэкспрессией HER2/neu. Предиктивная и прогностическая роль ИОЛ при раннем HER2-положительном РМЖ была продемонстрирована в объединенном анализе двух исследований - GeparQuattro и GeparQuinto. В группе пациентов высоким уровнем ИОЛ $\geq$ 60% наблюдалось увеличение частоты полного патоморфоза [120]. Увеличение ИОЛ на каждые 10% оказалось независимым предиктором полного патоморфоза в многофакторном анализе, что было более выражено в подгруппе с положительной экспрессией гормональных рецепторов. Схожие данные были получены в мета-анализе, включившем 5 рандомизированных исследований и 1256 пациентов, высокий уровень ИОЛ был независимым прогностическим фактором достижения полного патоморфоза при всех режимах неoadьювантной терапии [15]. Закономерности, полученные в работах по НАХТ, также актуальны и для АХТ. Так,

многофакторный анализ исследования III фазы Short-HER продемонстрировал снижение отношения риска развития отдаленных метастазов на 17% с увеличением уровня ИОЛ на каждые 10% [16]. Через пять лет наблюдения показатели выживаемости без отдаленных метастазов были значительно выше у пациентов с ИОЛ  $\geq 20\%$ .

### 1.4.3 Люминальный HER2-негативный рак молочной железы

Хотя высокий уровень ИОЛ при ТН РМЖ и HER2-положительном РМЖ ассоциирован с благоприятным прогнозом, их значение при люминальном HER2-негативном раке молочной железы до настоящего времени остается дискуссионным. Люминальный рак молочной железы характеризуется более низкой иммуногенностью и уровнем лимфоцитарной инфильтрации [95, 100]. Тем не менее, при ER+ опухолях наблюдается выраженная гетерогенность степени инфильтрации ИОЛ и мутационной нагрузки (ТМВ) - 12,5% пациентов с люминальным HER2-негативным раком имеют высокий уровень ИОЛ ( $\geq 60\%$ ) [114]. В исследовании BIG 02-98 продемонстрировано, что увеличение уровня ИОЛ при раннем ER+ раке молочной железы на каждые 10% ассоциировано с достоверным ухудшением общей выживаемости [94]. Несколько ретроспективных исследований показали, что инфильтрация CD8+ Т-лимфоцитами при ER+ раке молочной железы ассоциирована с ухудшением прогноза, в то время как субпопуляции FOXP3 и CD4+ не влияли на прогноз [23]. По данным мета-анализа, включившего 3771 пациентов с ранним раком молочной железы, получивших неoadьювантную химиотерапию, высокий уровень ИОЛ при люминальном HER2-негативном раке молочной железы достоверно связан с увеличением частоты достижения полного патоморфоза, которая составила 28% в группе с ИОЛ  $\geq 60\%$  против 6% при ИОЛ  $< 10\%$ . Однако, эти данные не транслировались в улучшение отдаленных результатов, более того, высокий уровень ИОЛ был ассоциирован с достоверным ухудшением общей выживаемости [114]. В нескольких работах было показано, что высокая степень

инфильтрации ИОЛ при люминальном HER2-негативном раке молочной железы связана с более низкой частотой снижения уровня ki67 на фоне двухнедельного курса неoadьювантной гормонотерапии и наличием мутации в гене PIK3CA [23, 82, 123].

### **1.5 Методология определения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов и заключение**

Таким образом, высокий уровень ИОЛ имеет прогностическую роль при всех подтипах рака молочной железы, а также является предиктором эффективности системной терапии ТН и HER2-позитивного РМЖ. Данные исследований в большей степени свидетельствуют о негативном влиянии высокого уровня ИОЛ на прогноз при люминальном HER2-негативном раке молочной железы в отличие от других подтипов.

Для более глубокого понимания прогностической и предиктивной роли ИОЛ в контексте различных подтипов рака молочной железы, необходимо стандартизировать методы их оценки. На фоне различных интерпретаций и подходов к количественному и качественному анализу ИОЛ в опухолевых тканях, возникла потребность в разработке единых рекомендаций для патоморфологов. Именно эти задачи были решены в результате 16-й международной конференции в Санкт-Галлене. Данные рекомендации были необходимы так как до них единого стандарта не существовало, и каждый врач патоморфолог трактовал содержание ИОЛ по «своему» стандарту. Было неясно: какое поле зрения брать для обсчета, считать количество клеток или процент их содержания, какие лимфоциты наиболее важны – стромальные или интратуморальные и многие другие вопросы. В 2013 году был проведен опрос среди всех патоморфологов принимавших участие в исследованиях III фазы и составлен единый алгоритм по определению ИОЛ, который кратко выглядел следующим образом: лимфоциты оцениваются только в строме опухоли, при этом исключаются участки некроза, артефакты и лимфоциты, находящиеся за пределами края опухоли. Не учитываются

лимфоциты вокруг протоковой карциномы *in situ* (DCIS) и нормальных долек. В расчет берутся все мононуклеарные клетки, такие как лимфоциты и плазматические клетки, за исключением полиморфноядерных лейкоцитов. Для оценки достаточно одного гистологического среза толщиной 4–5 микрон при увеличении  $\times 200$ – $400$ . Послеоперационные срезы более предпочтительны чем биопсийные образцы для более точной оценки. Оценка ИОЛ должна быть усредненной по всей площади опухоли, без фокусировки на отдельных "горячих точках" с высокой концентрацией лимфоцитов.

Проблемы в определении опухолево-инфильтрирующих лимфоцитов в молочной железе по стандартной методике связаны с несколькими ключевыми аспектами. Во-первых, существует значительная гетерогенность в распределении ИОЛ как внутри опухоли, так и между различными участками опухоли. Это затрудняет однозначную оценку, особенно при использовании биопсийных образцов, которые могут не отражать полную картину распределения ИОЛ. Также сложность определения точной доли стромальных ИОЛ заключается в необходимости исключать артефакты, некротические области и зоны воспаления вокруг биопсийных участков, что может усложнять интерпретацию данных. Интратуморальные ИОЛ (лимфоциты, находящиеся непосредственно внутри опухолевых клеток) труднее визуализируются на стандартных окрашенных срезах, что усложняет их оценку без дополнительных методов, таких как иммуногистохимия.

Во-вторых, одной из ключевых проблем является отсутствие согласованных пороговых значений. В настоящее время методика фокусируется на оценке ИОЛ как непрерывного параметра, что вызывает трудности в интерпретации результатов для принятия клинических решений. Кроме того, различия в интерпретации результатов между патоморфологами могут влиять на воспроизводимость данных. В настоящее время нет чётко определённых стандартов, которые бы минимизировали межлабораторные и межперсональные различия в оценке ИОЛ, что также является проблемой для стандартизации методики.

В настоящее время изучаются новые методы оценки опухолеинфильтрирующих лимфоцитов, которые могут быть применены в рамках научных исследований. Иммуногистохимия уже используется для иммунофенотипирования лимфоцитов, таких как CD45, CD8 и CD3, однако пока неясно, насколько эти маркеры имеют значимость в клинической практике. Рабочая группа по ИОЛ не рекомендует использование иммуногистохимии для определения конкретных субпопуляций лимфоцитов за пределами научных исследований до получения дополнительных данных.

Кроме того, машинные методы оценки, несмотря на их потенциал, ещё не были широко применены в крупных исследованиях, что делает эту область перспективной для дальнейшего изучения. Новые технологии, такие как CyTOF (масс цитометрия) и проточная цитометрия, которые могут анализировать сигнатуры опухолевых инфильтратов, пока остаются исключительно в сфере научных исследований. Тем не менее дальнейшее развитие этих методов может привести к внедрению специфических иммунных маркеров в клиническую практику.

При солидных опухолях уже были работы, где исследовались ИОЛ методом проточной цитометрии и оценивалась их значимость. Например, при меланоме исследования показывают, что уровень CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов в опухоли является важным прогностическим фактором. Высокий уровень этих клеток ассоциируется с лучшей выживаемостью пациентов и более высокой эффективностью иммунотерапии [53]. Проточная цитометрия также применяется для анализа ИОЛ при раке яичников. В одном из исследований показано, что высокие уровни CD8<sup>+</sup> Т-клеток ассоциируются с улучшенной выживаемостью, в то время как увеличение регуляторных Т-клеток может способствовать ухудшению прогноза [118]. При исследовании глиобластомы у мышей проточная цитометрия использовалась для выделения и анализа различных подтипов Т-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, что не проводилось ранее. Метод позволял детализировать иммунный профиль опухолевой микросреды, включая

такие подтипы, как цитотоксические Т-клетки (CD8+), хелперные Т-клетки (CD4+), а также Т-регуляторные лимфоциты [48].

Наше исследование открывает новые перспективы для использования проточной цитометрии в оценке ИОЛ при раке молочной железы. Важность ИОЛ как прогностического и предиктивного фактора уже признана, однако дальнейшее усовершенствование методов их количественной и качественной оценки является ключевым для повышения точности диагностики и эффективности терапии. Проточная цитометрия, благодаря своей высокой чувствительности и способности детализировать различные субпопуляции иммунных клеток, имеет значительный потенциал для усовершенствования предиктивной диагностики. Этот метод позволяет не только точно идентифицировать ключевые иммунные клетки, но и их субпопуляции, что несомненно важно для понимания иммунных механизмов опухоли и выбора оптимальных терапевтических стратегий.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Общие критерии включения в исследование

В проспективное одноцентровое поисковое исследование по оценке состава и влияния субпопуляционного состава опухоли инфильтрирующих лимфоцитов на проводимую неоадьювантную химиотерапию у пациентов с диагнозом рак молочной железы было включено 179 пациенток, получавших неоадьювантную химиотерапию с 2018 по 2023 гг. в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина. В исследование включались пациентки с тройным негативным и люминальным В HER2-негативным фенотипом первичной опухоли, которые были разделены на 2 исследуемые группы соответственно фенотипу опухоли.

При проведении исследования мы руководствовались следующими критериями включения:

- впервые выявленный первично-операбельный и местно-распространенный РМЖ (стадии T<sub>2-4</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub>);
- наличие морфологического подтверждения диагноза;
- для ТН подтипа: отрицательные РЭ, РП, HER2;
- для люминального В HER2-негативного подтипа: положительный статус РЭ и/или РП, отрицательный HER2/neu, ki67>20%;
- для ER-low субподтипа: РЭ 1-10% (до 5 баллов РЭ по шкале Allred) независимо от уровня РП и ki67, отрицательный HER2/neu;
- отсутствие серьезной сопутствующей патологии, делающей невозможным проведение НАХТ в полном объеме;
- подписанное информированное согласие;

Критериями исключения являлись:

- предшествующее лечение по поводу РМЖ в течение 5 лет (начало неоадьювантной ХТ, лучевая терапия, хирургическое вмешательство);
- тяжелая сопутствующая патология;
- беременность и лактация;

## 2.2 Общие процедуры, проводимые в рамках исследования

На этапе скрининга всем пациентам проводилось полное клинико-лабораторное и инструментальное обследование с целью уточнения степени распространения болезни, а также оценка функций внутренних органов и систем. Клинико-лабораторное исследование включало ОАК, БХ, Коагулограмму. Инструментальные методы включали стандартный перечень обследований: пациентам выполнялись маммография (ММГ) и УЗИ молочных желез и регионарных лимфоузлов, УЗИ или КТ органов брюшной полости и малого таза, рентгенография органов грудной клетки, сцинтиграфия костей, а при наличии в них очагов повышенного накопления радиофармпрепарата проводилось ОФЭКТ исследование, оценка функции сердечно-сосудистой системы (ЭКГ, Эхо/КГ).

Всем пациенткам до начала лечения выполнялась core-биопсия первичной опухоли и/или метастатических лимфоузлов с гистологическим и иммуногистохимическим (ИГХ) исследованием. Перечень ИГХ показателей включал определение рецепторов эстрогена (РЭ) и рецепторов прогестерона (РП), HER2<sup>neu</sup> и ki67. При выявлении HER2<sup>neu</sup> 2+ статуса проводилось FISH исследование. Во всех случаях поражение регионарных лимфоузлов подтверждено цитологически до начала НАХТ.

Анализ мутационного статуса *BRCA1/2* производился всем пациенткам методом ПЦР ДНК лимфоцитов периферической крови с определением локусов, характерных для славянской популяции (*BRCA1 – 5382insC, 185delAG, T300G, 4153delAA, 3875delA, 3819del5, C61G, 2080delA; BRCA2 – 6174delT*). Высокопроизводительное секвенирование (NGS) генов *BRCA1/2* выполнялось в соответствии с критериями Российского общества клинической онкологии (RUSSCO).

Всем пациенткам была проведена неoadьювантная химиотерапия с последовательным применением антрациклинов и таксанов. Выбор режима химиотерапии основывался на клинико-морфологической характеристике опухоли. При ТН РМЖ всем пациенткам была проведена НАХТ в режиме 4ACdd

(доксорубицин 60 мг/м<sup>2</sup> + циклофосфамид 600 мг/м<sup>2</sup>) 1 раз в 2 недели, затем 12 Паклитаксел 80мг/м<sup>2</sup> + Карбоплатин АUC 2 еженедельно. При люминальном В HER2-негативном РМЖ проводилась НАХТ в режиме 4ACdd (доксорубицин 60 мг/м<sup>2</sup> + циклофосфамид 600 мг/м<sup>2</sup>) 1 раз в 2 недели, затем 4 Доцетаксел 75 мг/м<sup>2</sup> 1 раз в 3 недели. Дозоинтенсивные режимы ХТ проводились на фоне профилактики нейтропении гранулоцитарными колониестимулирующими факторами роста (Г-КСФ).

По окончании НАХТ пациенткам было выполнено повторное комплексное обследование с последующим хирургическим лечением.

### **2.3 Оценка эффективности проводимого лечения**

Эффективность неoadьювантной химиотерапии в процессе терапии оценивали клинически (осмотр, пальпация) перед каждым курсом НАХТ и по данным маммографии + ультразвукового исследования молочных желез и регионарных лимфоузлов между 1-м и 2-м блоками химиотерапии и по ее окончании.

В послеоперационном этапе было проведено гистологическое изучение резидуальной опухоли с целью определения степени лекарственного патоморфоза используя калькулятор RCB (Residual Cancer Burden):

- RCB - 0 (pCR/полный патоморфологический ответ) - значение индекса 0
- RCB - I (минимальная остаточная опухоль) - менее 1.36, низкий риск прогрессирования заболевания
- RCB - II (умеренная остаточная опухоль)- 1.36-3.28, промежуточный риск прогрессирования заболевания
- RCB - III (выраженная остаточная опухоль) - более 3.28, высокий риск прогрессирования заболевания.

## 2.4 Статистическая обработка

С учетом поискового характера работы выведение статистической гипотезы не предусмотрено. Статистическая обработка материала и расчеты проведены с использованием статистического пакета программ IBM SPSS Statistics v.26.0 и Microsoft® Excel® LTSC MSO (версия 2302). Достоверность различий между количественными показателями вычисляли с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Уилкоксона для выборок <50 наблюдений и Краскала–Уоллеса для выборок >50. Для сравнения качественных параметров применяли критерий Фишера и  $\chi^2$  Пирсона. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$  (допустимый уровень альфа-ошибки 5%). Определение границ с оптимальным соотношением чувствительности и специфичности выполняли методом построения ROC-кривой. Взаимосвязь признаков оценивали с помощью логистической регрессии. Для определения предиктивных маркеров достижения pCR проведен подгрупповой анализ с 95% доверительным интервалом (ДИ). Учитывая разный характер распределения переменных, отсутствие установленных референсных значений, все данные представлены в виде медианы (Me), и 25-го и 75-го перцентилей (квартилей).

## 2.5 Иммунологические исследования методом проточной цитофлуориметрии

Образцы опухолевой ткани для иммунологического исследования брали непосредственно перед началом химиотерапии. Забор материала для исследования проводился методом core-биопсии образования молочной железы под УЗИ контролем. Образцы ткани помещали в 2,0 мл охлажденного 0,9% раствора натрия хлорида, фрагментацию и анализ проводили в тот же день или хранили при +4°C не более 12 часов. Лимфоциты выделяли из опухолевой ткани клеточной суспензии (ЛИО) по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Для исследования субпопуляционного состава ЛПК и ЛИО проводили 2-, 3- и 4-

цветное окрашивание клеток с использованием панели моноклональных антител к поверхностным и внутриклеточным (Perforin) маркерам лимфоцитов. Использовали коммерческие МКА (BeckmanCoulter, BDBiosciences), конъюгированные различными флуорохромами FITC, PE, PE-Cy5, APC к дифференцировочным антигенам CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD28, CD11b, CD25, CD28, CD127, HLA-Dr, CD19, CD45, CD273, CD274, CD278, CD279. Методом проточной цитофлуориметрии на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur производства компании Becton Dickinson (США) определяли процентное содержание следующих популяций лимфоцитов (Таблица 1).

**Таблица 1** – Изучаемые субпопуляции

1.	CD3+CD4+	Т-хелперы
2.	CD3+CD8+	Т-цитотоксические лимфоциты
3.	CD8+	Общий пул CD8 позитивных клеток
4.	CD3+	Общий пул CD3 позитивных клеток
5.	CD4+CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-low</sup>	Т-регуляторные
6.	CD3-CD19+	В-лимфоциты
7.	CD3-CD16+CD56+	НК-клетки
8.	CD3+CD16+CD56+	НКТ-клетки
9.	CD4+CD25+	активированные CD4 лимфоциты
10.	CD4+CD279+	CD4+PD1+
11.	CD8+CD279+	CD8+PD1+
12.	CD3-CD8+	НК-клетки
13.	CD3+HLA-DR+	активированные Т-лимфоциты
14.	CD3-HLA-DR+	В-лимфоциты, активированные Т-лимфоциты

15.	HLA-DR+	В-лимфоциты, активированные Т-лимфоциты
16.	CD8+CD28+	CD8+ лимфоциты несущие рецептор костимулирующего сигнала Т-лимфоцитов CD28+
17.	CD8+CD28-	CD8+ лимфоциты со сниженным костимулирующим сигналом Т-лимфоцитов CD28-
18.	CD8+CD28+/CD8+CD28-	коэффициент активации CD8+ Т-лимфоцитов
19.	CD8+CD16+	цитотоксические Т-клетки с экспрессией CD16
20.	CD16+Perforin+	цитотоксические Т-клетки с экспрессией CD16 и перфорина
21.	CD16+	Fc-фрагмент молекулы иммуноглобулина G
22.	CD4+/CD8+	иммунорегуляторный индекс
23.	11b+28-	эффекторные лимфоциты
24.	11b+28+	эффекторные клетки памяти
25.	11b-28-	регуляторные Т-лимфоциты
26.	11b-28+	наивные лимфоциты
27.	CD8+CD4+	дубль-позитивные клетки, высокодифференцированные клетки памяти
28.	CD273+	PDL-2
29.	CD274+	PDL-1
30.	CD4+CD152+	регуляторные Т-клетки с экспрессией гликопротеина цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA4)

31.	CD152+CD25+	активированные регуляторные Т-клетки с экспрессией гликопротеина цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA4)
32.	CD4+CD278+	активированные Т-хелперы
33.	CD278+CD25+	активированные CD4 лимфоциты с экспрессией костимулятора Т-лимфоцитов (CD278+)

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Тройной негативный рак молочной железы

#### 3.1.1 Характеристика больных

В исследование включено 90 пациенток. Медиана возраста составила 49 лет (29–71). У 32 пациенток (35,5%) была II клиническая стадия заболевания, III стадия выявлена в 58 случаях (64,4%). Большинство (59 человек — 66%) имели поражение регионарных лимфатических узлов. В 55 (61%) наблюдениях отмечен местнораспространенный первично-неоперабельный процесс (T3-4 и/или N2/N3), в 35 (39%) — первично-операбельный. Наибольшая группа пациенток с опухолью менее 5 см — T2 (47,8%, n=43), а самая распространенная стадия — T2N0 (21,1%, n=19). Частота герминальных мутаций в генах BRCA1/2 составила 16,7% (n=15). В 99% случаев опухоль была представлена инвазивным раком неспецифического типа: в 51% наблюдений — степени злокачественности G2, в 49% — G3. (Таблицы 2, 3).

**Таблица 2** – Характеристика пациентов с ТН РМЖ

Характеристика	N = 90	%
<b>Возраст</b>		
Средний 49,2 (29–71)		
≤ 50	52	57,8
>50	38	42,2
<b>Распространенность</b>		
Операбельный	35	39
Местнораспространенный	55	61

<b>cT</b>		
T1	1	1,1
T2	43	47,8
T3	8	8,9
T4	38	42,2
<b>cN</b>		
0	31	34
1	23	26
2	18	20
3	18	20
<b>Стадия</b>		
IIA	19	21,1
IIB	13	14,4
IIIA	11	12,2
IIIB	29	32,2
IIIC	18	20,0
<b>Гистологический подтип</b>		
Инвазивный протоковый	89	98,9
Метапластический	1	1,1
<b>Степень злокачественности (G)</b>		
1	0	0
2	46	51,1
3	44	48,9
<b>BRCA1/2-статус</b>		
BRCA1/2 дикий тип	75	83,3
BRCA1/2 мутация	15	16,7

Данные по отношению размера первичной опухоли к степени поражения регионарных лимфоузлов при ТН РМЖ представлены в таблице 3.

**Таблица 3** – Комбинационная таблица отношения размера первичной опухоли к степени поражения регионарных лимфоузлов при ТН РМЖ

Т	N				
	0	1	2	3	Всего
1	0 0%	0 0%	0 0%	1 1,1%	1
2	19 21,1%	10 11,1%	8 8,9%	6 6,7%	43
3	3 3,3%	3 3,3%	1 1,1%	1 1,1%	8
4	9 10%	10 11,1%	9 10%	10 11,1%	38
Всего	31	23	18	18	90

#### *Эффективность лечения*

Все пациентки получили планируемые 4 курса неoadъювантной химиотерапии по схеме доксорубицин + циклофосфамид 1 раз в 14 дней, отмен курсов не было. Средняя дозоинтенсивность составила 95%.

Второй блок НАХТ в полном объеме (12 курсов паклитаксел + карбоплатин еженедельно) был выполнен у 78 из 90 пациенток (87%), со средней дозоинтенсивностью паклитаксела 91,6% и 86% у карбоплатина.

Хирургический этап лечения был выполнен у всех 90 пациенток, в том числе в 1 случае у пациентки с исходной клинической ПА стадией (сT<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) радикальная резекция проведена на фоне прогрессирования заболевания за счет увеличения первичной опухоли и появления ипсилатеральных аксиллярных лимфоузлов (впоследствии данная пациентка получила курс адъювантной химиотерапии и курс лучевой терапии).

Органосохраняющее вмешательство выполнено 32 пациенткам (35,5%), мастэктомия – 58 (64,5%). Полный патоморфологический ответ (RCB 0)

достигнут в 46 (51,1%) случаях, RCB I - в 13 (14,4%), RCB II – в 20 (22,2%), RCB III – в 11 (12,2%) (Таблицы 4, 5, 6).

**Таблица 4** – Патоморфологический ответ после завершения химиотерапии

<b>Патоморфологический ответ на лечение</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
RCB 0	46	51,1
RCB 1	13	14,4
RCB 2	20	22,2
RCB 3	10	11,1
Прогрессирование*RCB 3	1	1,1
*У 1 пациентки с операбельным раком выполнено хирургическое лечение на фоне местного прогрессирования		

**Таблица 5** – Патоморфологический ответ после НАХТ в зависимости от размера первичной опухоли (T)

<b>T</b>	<b>RCB 0, N (%)</b>	<b>RCB 1, N (%)</b>	<b>RCB 2, N (%)</b>	<b>RCB 3, N (%)</b>
<b>1</b>	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>2</b>	27 (62.8)	4 (9.3)	9 (20.9)	3 (7.0)
<b>3</b>	3 (37.5)	2 (25.0)	3 (37.5)	0 (0.0)
<b>4</b>	15 (39.5)	7 (18.4)	9 (23.7)	7 (18.4)

**Таблица 6** – Патоморфологический ответ после НАХТ в зависимости от степени поражения регионарных лимфоузлов (N)

<b>N</b>	<b>RCB 0, N (%)</b>	<b>RCB 1, N (%)</b>	<b>RCB 2, N (%)</b>	<b>RCB 3, N (%)</b>
<b>0</b>	20 (64.5)	2 (6.5)	8 (25.8)	1 (3.2)
<b>1</b>	12 (52.2)	3 (13.0)	3 (13.0)	5 (21.7)
<b>2</b>	7 (38.9)	3 (16.7)	6 (33.3)	2 (11.1)
<b>3</b>	7 (38.9)	5 (27.8)	4 (22.2)	2 (11.1)

При анализе степени патоморфологического ответа в зависимости от клинической стадии заболевания отмечено, что при II стадии частота RCB 0 составила 62,5% и была выше, чем при III стадии – 44,8%, различия не достигли статистической значимости ( $p=0,083$ ), что может быть связано с небольшим числом наблюдений в группах (Таблица 7).

**Таблица 7** – Патоморфологический ответ после НАХТ в зависимости от клинической стадии заболевания

Стадия	RCB 0, N (%)	RCB 1, N (%)	RCB 2, N (%)	RCB 3, N (%)
II (N=32)	20 (62,5)	2 (6,3)	8 (25,0)	2 (6,3)
IIА	13 (68,4)	0 (0)	5 (26,3)	1 (5,3)
IIВ	7 (53,8)	2 (15,4)	3 (23,1)	1 (7,7)
III (N=58)	26 (44,8)	11 (19,0)	13 (22,4)	8 (13,8)
IIIА	6 (54,5)	2 (18,2)	2 (18,2)	1 (9,1)
IIIВ	13 (44,8)	4 (13,8)	7 (24,1)	5 (17,2)
IIIС	7 (38,9)	5 (27,8)	4 (22,2)	2 (11,1)

Так, у пациентов с первично-операбельным ТН РМЖ (IIА-IIIА стадии) частота достижения полного патоморфологического ответа составляла 61,1%, в то время как у пациентов с местно-распространенным первично-неоперабельным ТН РМЖ (IIIВ-IIIС стадии) эта частота составляла 44,4%. Однако различия между этими значениями не достигли статистической значимости ( $p=0,091$ ). При местно-распространенном первично-неоперабельном процессе, к которому относят Т4 при любом статусе N или N2-3 независимо от статуса T, были отмечены некоторые особенности в отношении чувствительности к ХТ. При наличии Т4 и при любом статусе N частота RCB 0 составила 39,5% против 52,9% при N2-3 и меньшей стадии T (Т1-3) ( $p=0,262$ ). То есть, при III стадии наличие Т4 являлось более неблагоприятным фактором, чем распространенность заболевания за счет регионарных лимфоузлов (N2-3) в плане достижения полного

патоморфологического ответа на НАХТ. Частота RCB I также была выше при наличии T1-3N2-3, чем при T4N0-3: 23,5% и 18,4% соответственно (Таблица 8).

**Таблица 8** – Патоморфологический ответ после НАХТ при первично-операбельном и местно-распространенном ТН РМЖ в зависимости от причин отношения к этой группе: или T4 или N2-3

<b>Распространенность</b>	<b>RCB 0, N (%)</b>	<b>RCB 1, N (%)</b>	<b>RCB 2, N (%)</b>	<b>RCB 3, N (%)</b>
Первично-операбельный	22 (61,1)	3 (8,3)	9 (25,0)	2 (5,6)
Местно-распространенный	24 (44,4)	10 (18,5)	12 (22,2)	8 (14,8)
T4N0-3	15 (39,5)	7 (18,4)	9 (23,7)	7 (18,4)
T1-3N2-3	9 (52,9)	4 (23,5)	3 (17,6)	1 (5,9)

### **3.1.2 Субпопуляционный состав инфильтрирующих опухоль лимфоцитов перед началом лечения**

Анализ субпопуляционного состава ИОЛ до лечения был проведен с оценкой 31 субпопуляции, включая минорные, и двух соотношений, таких как иммунорегуляторный индекс (CD4+/CD8+) и соотношение CD8+ лимфоцитов, несущих на себе рецептор костимулирующего сигнала Т-лимфоцитов CD28 (CD8+CD28+/CD8+CD28-), однако с разным числом наблюдений, что связано с низкой клеточностью полученного при core-биопсии до лечения материала в некоторых образцах (Таблица 9). В дальнейший анализ были включены только субпопуляции с количеством наблюдений более 10.

Общее процентное содержание ИОЛ в опухоли оценено у 70/90 (77,7%) пациенток, среднее значение составило 3% (мин. – 0, макс. – 27,6%, медиана – 0,8%).

**Таблица 9** – Субпопуляционный состав ИОЛ, изучаемый в рамках исследования

Субпопуляция	Ме (квартили), %	N
CD3+CD4+	46,7 (37,8-51,6)	51
CD3+CD8+	40,5 (32,7-50,3)	55
CD8+	42,8 (34,4-52,8)	56
CD3+	88,9 (80,7-92,5)	59
CD4+CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup>	13,2 (5,8-19,0)	33
CD3-CD19+	2,1 (0,8-4,6)	51
CD3-CD16+CD56+	4,5 (2,1-9,8)	55
CD3+CD16+CD56+	9,3 (5,7-12,7)	55
CD4+CD25+	9,9 (7,9-13,3)	37
CD4+CD279+	12,9 (10,3-22,7)	39
CD8+CD279+	14,2 (7,9-20,8)	39
CD3-CD8+	1,85 (1,1-3,2)	56
CD3+HLA-DR+	10,7 (2,4-29,3)	34
CD3-HLA-DR+	2,8 (0,7-5,5)	34
HLA-DR+	19,3 (3,2-34,6)	34
CD8+CD28+	11,5 (7,8-18,5)	37
CD8+CD28-	29,9 (25,3-38,1)	37
CD8+CD28+/CD8+CD28-	0,4 (0,2-0,7)	37
CD8+CD16+	3,4 (2,2-5,9)	16
CD16+Perforin+	1,0 (0,4-1,9)	16
CD16+	6,7 (3,5-10,6)	16
CD4+/CD8+	1,1 (0,8-1,5)	45
11b+28-	21,2 (13,5-28,5)	34
11b+28+	12,2 (8,5-18,2)	34
11b-28-	43,8 (35,5-57,6)	34
11b-28+	17,5 (8,4-27,1)	35

CD8+CD4+	3,5 (1,9-5,8)	50
PDL-2	0,01 (0,0-0,45)	9
PDL-1	0,3 (0,01-1,96)	9
CD4+CD152+	3,6 (1,4-21,5)	8
CD152+CD25+	1,15 (0,6-1,5)	6
CD4+CD278+	9,2 (6,4-25,2)	5
CD278+CD25+	4,5 (2,5-13,5)	5

### 3.1.3 Влияние субпопуляционного состава на результаты неоадьювантной химиотерапии

Медиана содержания ИОЛ в группах с полным – 1,1% и неполным – 0,8% патоморфозом статистически значимо не различалась ( $p=0,271$ ). Уровень инфильтрации опухоли CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD8+, CD3+, CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-low</sup>, CD3-CD19+, CD3-CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD4+CD25+, CD4+CD279+, CD3-CD8+, CD3+HLA-DR+, CD3-HLA-DR+, HLA-DR+, CD8+CD28+, CD8+CD28+/CD8+CD28-, CD8+CD16+, CD16+Perforin+, CD16+, CD4+/CD8+, 11b+28-, 11b+28+, 11b-28-, 11b-28+, CD8+CD4+ не влиял на достижение RCB 0 (Таблица 10).

**Таблица 10** – Особенности субпопуляционного состава ИОЛ в первичной опухоли при различной степени выраженности лекарственного патоморфоза

Субпопуляция	RCB 0		RCB 1-3		p
	Me (квартили), %	n	Me (квартили), %	n	
CD3+CD4+	45,6 (34,7-50,9)	25	47,7 (41,7-52,7)	26	0,169
CD3+CD8+	42,4 (32,4-52,4)	28	40,5 (33,1-48,3)	27	0,485
CD3+	88,7 (80,9-92,9)	29	88,9 (80,0-92,6)	30	0,934
CD8+	45,8 (33,4-54,6)	28	42,6 (35,3-49,4)	28	0,363

Продолжение таблицы 10

CD4+CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup>	12,7 (5,7-21,1)	15	14,4 (5,9-17,0)	18	0,901
CD3-CD19+	1,6 (0,9-4,5)	25	2,3 (0,7-7,1)	26	0,637
CD3-CD16+CD56+	4,7 (2,8-9,8)	27	3,9 (1,8-9,3)	28	0,341
CD3+CD16+CD56+	9,9 (7,1-16,9)	27	8,3 (4,7-11,9)	28	0,091
CD4+CD25+	10,9 (7,6-13,5)	18	9,7 (8,3-11,6)	19	0,730
CD4+CD279+	13,8 (10,7-27,1)	18	11,9 (10,2-16,9)	21	0,192
CD8+CD279+	18,6 (10,5-29,2)	18	12,4 (6,8-14,9)	21	<b>0,040</b>
CD3-CD8+	1,8 (1,2-3,4)	28	1,9 (1,0-2,9)	28	0,634
CD3+HLA-DR+	9,7 (2,4-29,6)	16	11,3 (2,8-29,4)	18	0,825
CD3-HLA-DR+	2,5 (0,2-4,9)	16	3,9 (0,8-7,1)	18	0,224
HLA-DR+	20,2 (2,8-36,5)	16	19,3 (3,5-34,6)	18	0,878
CD8+CD28+	13,4 (7,0-19,6)	18	11,5 (8,5-17,6)	19	0,964
CD8+CD28-	36,2 (28,4-47,8)	18	27,1 (20,4-33,3)	19	<b>0,003</b>
CD8+CD28+/CD8+CD28-	0,40 (0,2-0,6)	18	0,4 (0,3-0,8)	19	0,271
CD8+CD16+	3,7 (1,3-5,7)	7	3,0 (2,4-6,2)	9	1,000
CD16+Perforin+	1,0 (0,5-3,3)	7	0,8 (0,1-1,9)	9	0,252
CD16+	10,9 (5,1-17,4)	7	5,7 (2,8-7,9)	9	0,142
CD4+/CD8+	1,0 (0,6-1,4)	22	1,1 (0,9-1,6)	23	0,151
11b+28-	24,6 (12,8-29,7)	17	19,7 (14,6-28,2)	17	0,786
11b+28+	12,5 (9,6-20,4)	17	11,7 (8,1-16,4)	17	0,496
11b-28-	39,3 (33,3-57,3)	17	49,4 (39,8-58,0)	17	0,394
11b-28+	17,6 (8,4-28,6)	17	17,0 (8,0-28,7)	18	0,807
CD8+CD4+	3,3 (1,9-5,5)	24	3,7 (1,9-7,0)	26	0,756

При анализе субпопуляционного состава для популяций CD8+CD279+ и CD8+CD28- было выявлено достоверное различие в группах RCB 0 vs RCB I-III (Таблица 10). Так, субпопуляция CD8+CD279+ была определена в 39 образцах опухолей ТН РМЖ, частота ее составила 43% (39/90), медиана 14,2%. При полном патоморфологическом ответе медиана CD8+CD279+ составила 18,6% против

12,3% при неполном ( $p=0,033$ ). При уровне CD8+CD279+ выше медианы частота RCB 0 составила 57,9%, тогда как в подгруппе с содержанием CD8+CD279+ менее или равно медиане частота pCR составила 35% ( $p=0,152$ ) (Таблица 11).

**Таблица 11** – Частота pCR в зависимости от уровня CD8+CD279+

CD8+CD279+ n=39	pCR	
	Есть, n=18	Нет, n=21
$\leq$ Me, n=20	7/20 = 35,0%* 7/18 = 38,9%**	13/20 = 65,0%* 13/21 = 61,9%**
$>$ Me, n=19	11/19 = 57,9%* 11/18 = 61,1%**	8/19 = 42,1%* 8/21 = 38,1%**
P = 0,152	X <sup>2</sup> Пирсона = 2,05 Точный критерий Фишера = 0,205 V Крамера = 0,152	

Субпопуляция CD8+CD28- была определена в 37 образцах опухолей, частота составила 41% (37/90), медиана 29,9%. При полном патоморфологическом ответе медиана содержания CD8+CD28- составила 36,2% против 27,1% при неполном ( $p=0,003$ ).

При уровне CD8+CD28- выше медианы частота RCB 0 составила 72,2% против 26,3% в подгруппе с содержанием CD8+CD28- менее или равно медиане ( $p=0,005$ ) (Таблица 12).

**Таблица 12** – Частота pCR в зависимости от уровня CD8+CD28-

CD8+CD28- n=37	pCR	
	Есть, n=18	Нет, n=19
$\leq$ Me, n=19	5/19 = 26,3%* 5/18 = 27,8%**	14/19 = 73,7%* 14/19 = 73,7%**

>Me, n=18	13/18 = 72,2%* 13/18 = 72,2%**	5/18 = 27,8%* 5/19 = 26,3%**
P = 0,005	X <sup>2</sup> Пирсона = 7,88 Точный критерий Фишера = 0,009 V Крамера = 0,005	

\* — % в ряду; \*\* — % в столбце

Таким образом, высокий уровень инфильтрации CD8+CD28-иммунокомпетентными клетками в опухоли молочной железы статистически достоверно ассоциировался с большей частотой достижения RCB 0 при ТН РМЖ.

С учетом возможного различного содержания ИОЛ в опухоли при операбельном и местно-распространенном РМЖ, был проведен анализ ИОЛ в зависимости от распространенности опухоли.

Достоверных различий ни в общем процентном содержании ИОЛ, ни среди изучаемых субпопуляций при операбельном и местно-распространенном неоперабельном РМЖ не выявлено (Таблица 13).

**Таблица 13** – Особенности субпопуляционного состава ИОЛ в первичной опухоли при различной степени распространенности опухолевого процесса

Субпопуляция	Первично-операбельный		Местно-распространенный		p
	Me (квартили), %	n	Me (квартили), %	n	
CD3+CD4+	46,9 (43,4-56,0)	23	46,4 (36,0-51,1)	28	0,281
CD3+CD8+	38,5 (28,0-50,7)	23	41,9 (34,2-50,0)	32	0,344
CD3+	90,8 (81,0-93,8)	25	88,7 (80,6-91,2)	34	0,256
CD8+	40,7 (31,2-53,4)	23	44,0 (34,7-52,2)	33	0,489
CD4+CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-low</sup>	13,2 (5,8-19,4)	17	12,9 (5,8-19,1)	16	0,845

CD3-CD19+	1,8 (0,5-5,0)	22	2,2 (0,9-5,8)	29	0,430
CD3-CD16+CD56+	4,0 (1,8-10,0)	24	4,7 (2,5-8,8)	31	0,665
CD3+CD16+CD56+	9,2 (6,1-12,3)	24	9,4 (5,3-13,9)	31	0,905
CD4+CD25+	10,3 (8,2-14,9)	18	9,3 (7,7-12,8)	19	0,298
CD4+CD279+	13,3 (10,5-21,3)	18	12,5 (9,6-23,2)	21	0,878
CD8+CD279+	13,3 (7,9-21,0)	18	14,5 (7,7-21,6)	21	0,945
CD3-CD8+	2,0 (1,1-3,1)	23	1,5 (1,1-3,3)	33	0,560
CD3+HLA-DR+	18,4 (2,4-39,3)	14	9,7 (2,5-18,0)	20	0,323
CD3-HLA-DR+	2,6 (0,6-5,8)	14	2,8 (0,7-5,6)	20	0,717
HLA-DR+	30,8 (3,4-41,7)	14	16,4 (2,9-24,2)	20	0,231
CD8+CD28+	13,0 (8,2-20,7)	16	11,5 (7,3-16,9)	21	0,439
CD8+CD28-	27,6 (21,4-34,6)	16	33,3 (26,6-44,0)	21	0,138
CD8+CD28+/CD8+CD28-	0,6 (0,3-0,7)	16	0,4 (0,2-0,6)	21	0,195
CD8+CD16+	2,9 (2,2-5,2)	8	3,6 (1,8-7,7)	8	0,505
CD16+Perforin+	0,9 (0,3-1,7)	8	1,0 (0,4-3,1)	8	0,505
CD16+	5,4 (3,5-7,6)	8	8,9 (3,0-11,2)	8	0,382
CD4+/CD8+	1,2 (0,8-1,8)	21	1,1 (0,7-1,4)	24	0,178
11b+28-	19,7 (12,6-28,5)	15	22,7 (13,6-28,5)	19	0,945
11b+28+	10,9 (8,5-15,0)	15	12,6 (8,5-18,3)	19	0,560
11b-28-	39,3 (33,2-58,2)	15	44,4 (39,3-57,6)	19	0,607
11b-28+	17,6 (9,2-30,1)	15	15,4 (7,8-25,9)	20	0,458
CD8+CD4+	3,4 (1,9-5,7)	23	3,6 (2,1-7,4)	27	0,599

Учитывая полученные нами данные о том, что, при III стадии наличие T4 являлось более неблагоприятным фактором, чем распространенность заболевания за счет регионарных лимфоузлов (N2-3) в плане достижения полного патоморфологического ответа на НАХТ, был также проведен анализ популяций ИОЛ в зависимости от данных факторов. Статистически значимых различий в содержании изучаемых субпопуляций выявлено не было (Таблица 14).

**Таблица 14** – Особенности субпопуляционного состава ИОЛ в первичной опухоли при различной степени распространенности опухолевого процесса

Субпопуляция	T4N0-3		T1-3N2-3		p
	Me (квартили), %	n	Me (квартили), %	n	
CD3+CD4+	47,1 (34,7-51,1)	20	45,6 (36,5-50,0)	9	0,627
CD3+CD8+	41,9 (34,4-50,5)	24	39,7 (23,8-47,3)	9	0,309
CD3+	88,9 (79,6-91,5)	25	84,1 (77,8-90,9)	10	0,397
CD8+	43,3 (35,9-53,8)	25	44,0 (25,2-49,8)	9	0,465
CD4+CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup>	11,2 (5,8-16,2)	12	18,9 (6,8-24,9)	5	0,383
CD3-CD19+	2,2 (0,8-5,2)	22	4,5 (1,4-13,3)	8	0,170
CD3-CD16+CD56+	4,8 (2,2-8,3)	23	4,5 (2,9-9,4)	9	0,902
CD3+CD16+CD56+	9,6 (3,6-13,9)	23	7,1 (5,1-13,3)	9	0,805
CD4+CD25+	9,8 (6,9-11,9)	14	8,9 (7,3-14,0)	6	0,904
CD4+CD279+	12,2 (8,9-22,2)	16	12,0 (7,9-23,6)	6	0,747
CD8+CD279+	14,6 (5,9-20,4)	16	12,1 (9,1-25,9)	6	0,858
CD3-CD8+	1,7 (1,0-3,3)	25	1,3 (1,1-3,1)	9	0,878
CD3+HLA-DR+	8,5 (2,1-14,0)	15	14,7 (8,4-31,4)	6	0,154
CD3-HLA-DR+	2,9 (0,6-5,5)	15	4,2 (1,9-12,2)	6	0,519
HLA-DR+	14,2 (2,6-23,2)	15	26,8 (13,7-35,2)	20	0,154
CD8+CD28+	12,0 (9,0-18,7)	16	8,4 (7,1-14,3)	6	0,294
CD8+CD28-	31,6 (25,6-43,5)	16	34,8 (22,4-49,5)	6	0,747
CD8+CD28+/CD8+CD28-	0,4 (0,2-0,8)	16	0,4 (0,2-0,6)	6	0,693
CD8+CD16+	3,7 (1,3-8,1)	7	2,7	2	0,500
CD16+Perforin+	1,0 (0,4-2,4)	7	1,9	2	1,000
CD16+	8,2 (2,0-10,9)	7	7,4	2	1,000
CD4+/CD8+	1,1 (0,7-1,3)	18	1,2 (0,7-1,8)	7	0,495
11b+28-	22,7 (16,1-27,8)	15	13,6 (9,8-35,1)	5	0,612

11b+28+	13,3 (8,5-19,3)	15	12,5 (6,4-15,8)	5	0,349
11b-28-	47,1 (39,3-57,6)	15	43,1 (37,8-56,4)	5	0,866
11b-28+	15,4 (7,8-23,7)	16	30,9 (6,2-32,6)	5	0,495
CD8+CD4+	3,6 (2,3-7,4)	21	4,7 (2,1-8,7)	7	0,568

Несмотря на отсутствие статистически достоверных различий в содержании CD3+CD16+CD56+ (NKT-клеток) в группах с полным и неполным патоморфозом ( $p=0,091$ ), наше внимание привлекли численные различия в медианах: 9,9% и 8,3%, что является значимым для данной минорной популяции.

При дальнейшем анализе установлено, что при уровне CD3+CD16+CD56+ выше медианы частота pCR составила 63% против 35,7% в подгруппе с содержанием CD3+CD16+CD56+ менее или равно медианы (Таблица 15).

**Таблица 15** – Частота pCR в зависимости от уровня CD3+CD16+CD56+ субпопуляции ИОЛ при ТН РМЖ

CD3+CD16+CD56+ n=55	pCR	
	Есть, n=27	Нет, n=28
$\leq Me$ , n=28	10/28 = 35,7%* 10/27 = 37,0%**	18/28 = 64,3%* 18/28 = 64,3%**
$> Me$ , n=27	17/27 = 63,0%* 17/27 = 63,0%**	10/27 = 37,0%* 10/28 = 35,7%**
P=0,043	X <sup>2</sup> Пирсона = 4,084 Точный критерий Фишера = 0,060 V Крамера = 0,272	

\* — % в ряду; \*\* — % в столбце

При выделении узкой и очень небольшой подгруппы CD8+CD279+ и CD3+CD16+CD56+  $> Me$  (N=8) оказалось, что частота полных

патоморфологических регрессий в ней составила 87,5% против 27,3% при низких обоих показателях,  $p = 0,033$  (Таблица 16).

**Таблица 16** – Частота pCR в зависимости от уровня CD3+CD16+CD56+ / CD8+CD279+ (CD8+PD1+)

Популяции	Уровень CD8+CD279+ (CD8+PD1+)		
		> Me	≤ Me
Уровень CD3+CD16+CD56+ (NKT)	> Me	7/8 (87,5%)	4/9 (44,4%)
	≤ Me	3/9 (33,3%)	3/11 (27,3%)

Учитывая известные биологические взаимодействия между НК и NKT-клетками, был проведен анализ частоты морфологических регрессий в зависимости от их уровня (Таблица 17).

Выявлено, что высокий уровень NKT-клеток ассоциировался с частотой полных морфологических регрессий более 60% независимо от уровня НК, однако различия не достигли статистической значимости (возможно, в связи с небольшим числом наблюдений в сравниваемых подгруппах).

**Таблица 17** – Частота pCR в зависимости от уровня CD3+CD16+CD56+ (NK) / CD3+CD16+CD56+ (NKT)

Популяции	Уровень CD3+CD16+CD56+ (NK)		
		> Me	≤ Me
Уровень CD3+CD16+CD56+ (NKT)	> Me	10/16 (62,5%)	7/11 (63,6%)
	≤ Me	4/11 (36,4%)	6/17 (35,3%)

Таким образом, высокий уровень CD8+CD279+ (PD1) лимфоцитов (выше медианы) ассоциировался с большей частотой полных патоморфологических регрессий, а в сравнительно небольшой подгруппе с высоким содержанием CD8+CD279+ и CD3+CD16+CD56+ полный ответ отмечен в 87,5% случаев.

Мы оценили связь выявленных субпопуляций ИОЛ с вероятностью достижения pCR, и в однофакторном анализе такие критерии, как стадия T1-2, CD8+CD28- более медианы и CD3+CD16+CD56+ более медианы явились предикторами полного патоморфоза (Таблица 18).

**Таблица 18** – Предикторы полного патоморфомологического ответа на НАХТ при ТН РМЖ. Однофакторный анализ

Однофакторный анализ				
Фактор	ОР	95% ДИ		p
T 1-2	2,722	1,160	6,369	0,021
T 3-4				
N 0	2,308	0,941	5,662	0,068
N +				
G 1-2	0,913	0,399	2,088	0,829
G 3				
≤ 50 лет	1,558	0,671	3,614	0,302
> 50 лет				
Ki67 ≤40	0,205	0,041	1,024	0,053
Ki67 >40				
CD8+CD279+ > Me	0,392	0,107	1,428	0,156
CD4+CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> ≤Me	1,875	0,467	7,526	0,375
CD4+CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> >Me				
CD8+CD28- ≤Me	0,137	0,032	0,586	0,007
CD8+CD28- >Me				
CD3+CD16+CD56+ ≤Me	0,327	0,109	0,981	0,046
CD3+CD16+CD56+ >Me				
CD8+CD279+ < Me				

При проведении множественного логистического анализа выявлено, что стадия Т3-4 и CD3+CD16+CD56+ лимфоциты  $\leq$ Me достоверно увеличивают риск недостижения полного патоморфологического ответа (Таблица 19).

**Таблица 19** – Предикторы полного ответа на НАХТ

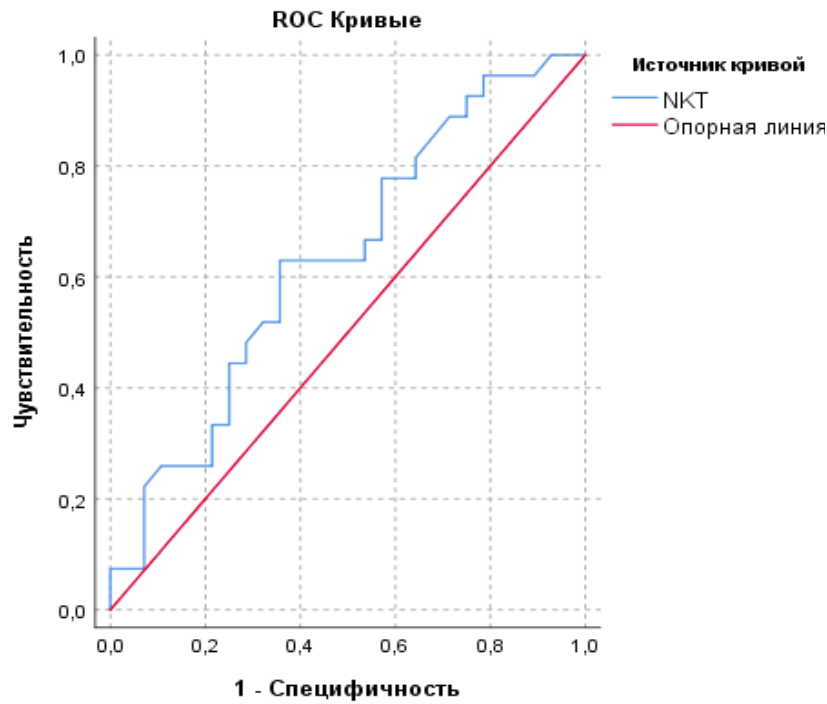
Многофакторный анализ				
Фактор	ОР	95% ДИ		p
Т 1-2	12,805	1,266	129,492	0,031
Т 3-4				
CD8+CD28- $\leq$ Me	0,185	0,029	1,196	0,076
CD8+CD28- $>$ Me				
CD3+CD16+CD56+ $\leq$ Me	0,065	0,006	0,660	0,021
CD3+CD16+CD56+ $>$ Me				

Итого, выделяя подгруппу больных со стадией Т 1-2 и CD3+CD16+CD56+ лимфоцитов больше медианы, можно достичь результата RCB 0 в 91,7% (11/12), в отличие от группы с противоположными значениями, где частота RCB 0 составила 23,1% (3/10).

С помощью ROC-анализа нами была предпринята попытка определения порогового уровня CD3+CD16+CD56+ лимфоцитов для достижения pCR (Рисунок 3).

Площадь под кривой составила 0,633, а качество предсказательной модели 0,49, что может соответствовать несостоятельности данного метода в нашем случае.

Пороговое значение со значением чувствительности 0,630 и чувствительностью 0,357 составило 9,3, что полностью совпадает с медианой для данной субпопуляции.



**Рисунок 3** – ROC-кривая при определении порогового уровня чувствительность/специфичность для CD3+CD16+CD56+ лимфоцитов

## 3.2 Люминальный рак молочной железы

### 3.2.1 Характеристика больных

В исследование включено 89 пациенток с ранним и местно-распространенным люминальным РМЖ, получавших неoadъювантную химиотерапию. Средний возраст – 46 +/- 9 лет (мин. 25, макс. 70), на момент начала лечения большая часть пациенток находились в пременопаузе (71,9%). По данным предоперационного обследования с целью определения клинической стадии заболевания II стадия выявлена у 9 (10,1%) пациенток, III стадия – у 80 (89,9%). Показания к предоперационной ХТ при II стадии определялись невозможностью выполнения органосохранной операции, на которую была настроена пациентка. По данным предоперационного гистологического исследования, протоковый рак (неспецифического типа) выявлен у 82 (92,1%) пациенток, дольковый – у 5 (5,6%), редкие подтипы, такие как муцинозный и тубулярный, в 2 случаях (2,2%). Большинство пациенток имели опухоли средней

степени злокачественности (G2) – 73 (82,0%), низкодифференцированные опухоли (G3) отмечены у 16 (18,0%) пациенток, высокодифференцированные (низкой степени злокачественности - G1) – не встречались (0%). Средний уровень пролиферативной активности (индекс Ki67) при люминальных опухолях составил 55,6 +/- 20,3% (мин. 20, макс. 90, медиана 55) (Таблица 20).

**Таблица 20** – Характеристика пациенток с люминальным подтипом РМЖ

Характеристика	N = 89	%
<b>Возраст</b>		
Средний 46,17 (25-70)		
≤ 50	63	70,8
>50	26	29,2
<b>Распространенность</b>		
Операбельный	13	14,6
Местнораспространенный	76	85,4
<b>cT</b>		
T1	2	2,2
T2	20	22,5
T3	9	10,1
T4	58	65,2
<b>cN</b>		
0	9	10,1
1	36	40,4
2	18	20,2
3	26	29,2
<b>Стадия</b>		
IIA	1	1,1
IIB	8	9,0
IIIA	12	13,5

ШВ	42	47,2
ШС	26	29,2
<b>Гистологический подтип</b>		
Инвазивный протоковый	82	92,1
Дольковый	5	5,6
Редкие	2	2,2
<b>Степень злокачественности (G)</b>		
1	0	0
2	73	82,0
3	16	18,0
<b>Менопаузальный статус</b>		
Пременопауза	64	71,9
Постменопауза	25	28,1

Все пациентки получили планируемые 4 курса неoadъювантной химиотерапии по схеме доксорубицин + циклофосфамид 1 раз в 14 дней, отмен курсов не было. Средняя дозоинтенсивность – 96%. Второй блок НАХТ в полном объеме (4 курса доцетаксела) был выполнен у 85 из 89 пациенток (95,5%), со средней дозоинтенсивностью 97%.

Хирургическое лечение было выполнено у 87 пациенток. В 1 случае операция не была выполнена в связи со смертью пациентки по неонкологической причине – вирусная пневмония тяжелой степени (пациентка была исключена из анализа), в 1 случае операция не проведена в связи с прогрессированием РМЖ на фоне НАХТ, что было отнесено к группе RCB 3. Полный патоморфологический ответ (RCB 0) достигнут в 14 (15,7%) случаях, а в остальных 83,2% оцененных случаев сохранялась резидуальная опухоль (Таблица 21). Для люминального В HER2-негативного РМЖ фактором благоприятного прогноза являлось достижение RCB 0-1, частота которых составила 25,8% (23/89).

**Таблица 21** – Патоморфологический ответ после завершения химиотерапии при люминальном подтипе РМЖ

Ответ на лечение	N = 89	%
RCB 0	14	15,7
RCB 1	9	10,1
RCB 2	43	48,3
RCB 3	22	24,7
Не оценено*	1	1,1
*У 1 пациентки RCB не оценен в связи со смертью по неонкологической причине		

При анализе степени патоморфологического ответа в зависимости от клинической стадии заболевания отмечено, что при II стадии частота RCB 0 составила 33,3% и была выше, чем при III стадии – 13,9%, различия не достигли статистической значимости ( $p=0,147$ ), но стоит отметить что в группе пациенток со II стадией заболевания было всего 9 пациенток по сравнению с 79 в группе с III стадией (Таблица 22).

**Таблица 22** – Патоморфологический ответ после НАХТ в зависимости от клинической стадии заболевания при люминальном В РМЖ

Стадия	RCB 0, N (%)	RCB 1, N (%)	RCB 2, N (%)	RCB 3, N (%)
II (N=9)	3 (33,3)	0 (0)	6 (66,7)	0 (0)
IIA	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
IIB	3 (37,5)	0 (0)	5 (62,5)	0 (0)
III (N=79)	11 (13,9)	9 (11,4)	37 (46,8)	22 (27,8)
IIIA	1 (8,3)	1 (8,3)	6 (50,0)	4 (33,3)
IIIB	7 (16,7)	4 (9,5)	24 (57,1)	7 (16,7)
IIIC	3 (12,0)	4 (16,0)	7 (28,0)	11 (44,0)

Как и при ТН РМЖ распространенность заболевания является важным клиническим фактором, влияющим на достижение патоморфологического ответа. При анализе было выявлено, что пациенты с первично-операбельным процессом достигали RCB 0 в 23,1% случаев против 14,7% при наличии местно-распространенного первично-неоперабельного РМЖ ( $p=0,269$ ). При местно-распространенном первично-неоперабельном процессе были отмечены некоторые особенности в отношении чувствительности к ХТ. При наличии Т4 и при любом статусе N частота RCB 0 составила 15,7% против 10,5% при N2-3 и меньшей стадии Т (Т1-3). То есть, распространенность заболевания за счет регионарных лимфоузлов (N2-3) при III стадии являлось более неблагоприятным фактором, чем наличие Т4 в плане достижения полного патоморфологического ответа на НАХТ, что разнится с данными, полученными при ТН РМЖ. Данный факт связан с разным клиническим течением болезни при разных подтипах РМЖ. Например, если при ТН РМЖ принципиально важно достижение RCB 0 для лучшего прогноза заболевания, то при люминальном раке молочной железы, группы RCB 0 и 1 практически не имеют достоверных различий в отдаленных результатах [98], в связи с чем было решено объединить эти 2 группы, при их анализе было выявлено что нет разницы между группами Т4 и N2-3 в достижении как RCB 0-1, так и RCB2-3 (27,6% против 22,2%; 72,4% против 77,8% соответственно) (Таблица 23).

**Таблица 23** – Патоморфологический ответ после НАХТ в зависимости от распространенности люминального РМЖ

Распространенность	RCB 0, N (%)	RCB1, N (%)	RCB2, N (%)	RCB3, N (%)
Первично-операбельный	3 (23,1)	0 (0)	8 (61,5)	2 (15,4)
Местно-распространенный	11 (14,7)	9 (12,0)	35 (46,7)	20 (26,7)
Т4N0-3	9 (15,5)	7 (12,1)	29 (50)	13 (22,4)
	16 (27,6)		41 (72,4)	

T1-3N2-3	2 (11,1)	2 (11,1)	7 (38,9)	7 (38,9)
	4 (22,2)		14 (77,8)	

Субпопуляционный состав ИОЛ у пациентов с люминальным РМЖ до лечения проанализирован в той же 31 субпопуляции, что и при ТН РМЖ (Таблица 24).

**Таблица 24** – Субпопуляционный состав ИОЛ, изучаемый в рамках исследования при люминальном РМЖ

Субпопуляция	Ме (квартили), %	N
CD3+CD4+	45,1 (38,6-53,0)	56
CD3+CD8+	43,1 (35,9-49,3)	59
CD8+	45,1 (38,2-53,3)	59
CD3+	88,6 (83,5-93,1)	59
CD4+CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-low</sup>	10,1 (6,0-15,1)	41
CD3-CD19+	3,3 (1,5-5,8)	55
CD3-CD16+CD56+	3,8 (2,2-8,4)	59
CD3+CD16+CD56+	7,5 (5,9-10,2)	58
CD4+CD25+	8,4 (5,4-12,0)	46
CD4+CD279+	13,2 (8,4-19,7)	47
CD8+CD279+	11,6 (5,9-20,3)	52
CD3-CD8+	1,8 (1,0-3,5)	58
CD3+HLA-DR+	11,6 (6,0-19,4)	36
CD3-HLA-DR+	5,3 (2,2-8,5)	36
HLA-DR+	17,4 (9,8-24,6)	36
CD8+CD28+	15,4 (10,5-20,1)	39
CD8+CD28-	30,7 (20,8-36,4)	39
CD8+CD28+/CD8+CD28-	0,5 (0,3-0,8)	39

CD8+CD16+	2,6 (2,0-7,0)	22
CD16+Perforin+	2,9 (1,1-4,6)	20
CD16+	6,7 (3,8-10,7)	20
CD4+/CD8+	1,0 (0,7-1,4)	52
11b+28-	16,7 (12,7-27,8)	38
11b+28+	10,5 (6,8-14,4)	38
11b-28-	45,1 (30,6-56,1)	38
11b-28+	19,5 (13,6-29,3)	38
CD8+CD4+	3,1 (2,1-4,9)	51
PDL-2	0,1 (0,0-0,2)	14
PDL-1	0,2 (0,1-0,4)	14
CD4+CD152+	1,2 (0,8-2,6)	16
CD152+CD25+	0,5 (0,1-1,2)	14
CD4+CD278+	6,9 (3,9-11,8)	10
CD278+CD25+	1,9 (0,9-5,9)	10

Общее процентное содержание ИОЛ в опухоли оценено у 72 (80,9%) пациенток и среднее значение составило 2,58% (мин. – 0, макс. – 30,6%, медиана – 0,9%). Общее содержание ИОЛ в группах с RCB0-1 и RCB2-3 статистически не различалось (3,92 против 2,09 соотв.;  $p=0,137$ ).

Уровень субпопуляций CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+, CD8+, CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-low</sup>, CD3-CD19+, CD3+CD16+CD56+, CD4+CD279+, CD3-CD8+, CD3+HLA-DR+, CD3-HLA-DR+, HLA-DR+, CD8+CD28+, CD8+CD28-, CD8+CD28+/CD8+CD28-, CD8+CD16+, CD16+Perforin+, CD16+, CD4+/CD8+, 11b+28-, 11b+28+, 11b-28-, 11b-28+, CD8+CD4+, PD-L1, PD-L2, CD4+CD152+, CD152+CD25+, CD4+CD278+, CD278+CD25+ не влиял на достижения RCB 0-1.

При анализе субпопуляционного состава для популяций CD4+CD25+ и CD8+CD279+ было выявлено статистически достоверное различие в группах RCB 0-1 vs RCB 2-3. Для субпопуляции CD3-CD16+CD56+ была отмечена численная

тенденция влияния на достижение RCB 0-1, однако р-критерий не выявил статистической значимости ( $p=0,055$ ). Принимая во внимание что, работа носит поисковый характер, а также небольшой набор данных, данная субпопуляция была включена в дальнейший анализ (Таблица 25).

**Таблица 25** – Особенности субпопуляционного состава ИОЛ в первичной опухоли люминального РМЖ при различной степени выраженности лекарственного патоморфоза

Субпопуляция	RCB 0-1		RCB 2-3		p
	Me (квартили), %	n	Me (квартили), %	n	
CD3+CD4+	45,7 (42,9-51,1)	16	45,0 (36,4-53,5)	39	0,574
CD3+CD8+	39,9 (34,9-44,5)	17	44,6 (37,5-52,2)	41	0,093
CD3+	88,6 (85,5-92,8)	17	87,8 (83,3-93,5)	41	0,953
CD8+	42,9 (39,8-46,4)	17	45,5 (38,9-54,5)	41	0,225
CD4+CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-low</sup>	11,0 (7,8-19,0)	10	9,9 (5,1-12,4)	30	0,242
CD3-CD19+	4,5 (2,8-7,4)	17	2,2 (1,3-5,1)	37	0,087
CD3-CD16+CD56+	2,7 (1,8-5,9)	17	4,2 (2,6-9,2)	41	<b>0,055</b>
CD3+CD16+CD56+	7,8 (6,7-8,6)	17	7,4 (5,9-10,8)	40	0,626
CD4+CD25+	11,2 (8,9-12,3)	14	7,5 (3,7-10,8)	31	<b>0,013</b>
CD4+CD279+	12,4 (10,3-18,5)	12	14,6 (8,2-20,5)	34	0,990
CD8+CD279+	9,5 (5,5-11,2)	15	16,3 (6,5-23,3)	36	<b>0,041</b>
CD3-CD8+	1,4 (1,0-2,4)	17	1,8 (1,1-3,6)	40	0,397
CD3+HLA-DR+	15,4 (11,2-22,0)	11	9,6 (5,9-16,0)	25	0,110
CD3-HLA-DR+	5,9 (3,6-8,7)	11	4,1 (1,6-7,1)	25	0,204
HLA-DR+	23,2 (16,4-29,1)	11	13,7 (9,3-23,3)	25	0,110
CD8+CD28+	10,3 (7,8-15,4)	9	16,8 (11,4-20,1)	29	0,092
CD8+CD28-	30,5 (25,4-34,2)	9	30,8 (21,1-36,0)	29	0,934
CD8+CD28+/CD8+CD28-	0,3 (0,2-0,5)	9	0,6 (0,4-0,8)	29	0,114

Продолжение таблицы 25

CD8+CD16+	2,2 (2,1-7,6)	5	2,9 (2,0-4,5)	16	1,000
CD16+Perforin+	1,4 (1,3-4,8)	5	2,9 (1,1-3,7)	14	0,896
CD16+	6,1 (3,8-10,7)	5	6,7 (4,0-10,6)	14	0,827
CD4+/CD8+	1,1 (0,9-1,2)	14	0,9 (0,6-1,4)	37	0,203
11b+28-	21,2 (12,8-30,3)	9	16,2 (12,7-23,3)	28	0,680
11b+28+	9,5 (7,7-13,3)	9	11,0 (6,8-14,3)	28	0,784
11b-28-	47,0 (30,1-49,3)	9	44,1 (37,7-55,8)	28	1,000
11b-28+	14,4 (13,0-16,2)	9	23,3 (14,3-29,1)	28	0,257
CD8+CD4+	3,0 (1,4-3,6)	13	3,3 (2,3-5,1)	37	0,214
PD-L1	0,1 (0,0-0,1)	2	0,1 (0,0-0,2)	12	0,503
PD-L2	0,2 (0,1-0,4)	2	0,2 (0,1-0,4)	12	0,775
CD4+CD152+	8,9 (0,8-16,9)	4	1,2 (0,8-1,8)	12	0,466
CD152+CD25+	0,6 (0,4-0,7)	2	0,5 (0,1-1,2)	12	0,927
CD4+CD278+	2,1 (2,1-2,1)	1	7,0 (4,8-11,3)	9	0,400
CD278+CD25+	1,5 (1,5-1,5)	1	2,1 (1,2-5,0)	9	0,727

В группе RCB 0-1 медиана CD3-CD16+CD56+ — 2,7 vs 4,2 в RCB 2-3 ( $p=0,055$ ). Повышенное содержание этой популяции — неблагоприятный фактор RCB 0-1 (37,9% vs 20,7%,  $p=0,149$ ) (Таблица 26).

**Таблица 26** – Взаимосвязь частоты pCR и уровня CD3-CD16+CD56+ субпопуляции ИОЛ при ЛВ РМЖ

CD3-CD16+CD56+ n=57	Патоморфоз	
	RCB 0-1, n=17	RCB 2-3, n=41
≤Me, n=29	11/29 = 37,9%* 11/17 = 64,7%**	18/29 = 62,1%* 17/41 = 43,9%**
>Me, n=29	6/29 = 20,7%* 6/17 = 35,3%**	23/29 = 79,3%* 23/41 = 56,1%**

p=0,149	X <sup>2</sup> Пирсона = 2,080 Точный критерий Фишера = 0,248 V Крамера = 0,149
---------	---

\* — % в ряду; \*\* — % в столбце

Содержание CD4+CD25+ активированных лимфоцитов было выше в группе RCB 0-1 и составило 11,2% против 7,5; в группе пациенток, не достигших выраженного патоморфологического ответа (p=0,013).

Анализ частоты патоморфоза в зависимости от медианы показал, что повышенное содержание CD4+CD25+ является благоприятным и достоверным фактором достижения RCB 0-1 (57,1% против 8,3%, p=0,001) (Таблица 27).

**Таблица 27** – Взаимосвязь частоты pCR и уровня CD4+CD25+ субпопуляции ИОЛ при ЛВ РМЖ

CD4+CD25+ n=44	Патоморфоз	
	RCB 0-1, n=14	RCB 2-3, n=31
≤Me, n=24	2/24 = 8,3%* 2/14 = 14,3%**	22/24 = 91,7%* 22/31 = 71,0%**
>Me, n=21	12/21 = 57,1%* 12/14 = 85,7%**	9/21 = 42,9%* 9/31 = 29,0%**
p=0,001	X <sup>2</sup> Пирсона = 12,450 Точный критерий Фишера = 0,001 V Крамера = 0,000	

\* — % в ряду; \*\* — % в столбце

Содержание CD8+CD279+ лимфоцитов было ниже в группе RCB 0-1 и составило 9,5% против 16,3% в группе RCB 2-3 (p=0,041).

Анализ частоты патоморфоза в зависимости от медианы показал, что сниженное содержание CD8+CD279+ является благоприятным и достоверным фактором достижения RCB 0-1 (46,2% против 12,0%, p=0,007) (Таблица 28).

**Таблица 28** – Взаимосвязь частоты pCR и уровня CD8+CD279+ субпопуляции ИОЛ при ЛВ РМЖ

CD8+CD279+ n=50	Патоморфоз	
	RCB 0-1, n=15	RCB 2-3, n=36
≤Me, n=26	12/26 = 46,2%* 12/15 = 80,0%**	14/26 = 53,8%* 14/36 = 38,9%**
>Me, n=25	3/25 = 12,0%* 3/15 = 20,0%**	22/25 = 88,0%* 22/36 = 61,1%**
p=0,007	X <sup>2</sup> Пирсона = 7,161 Точный критерий Фишера = 0,013 V Крамера = 0,007	

\* — % в ряду; \*\* — % в столбце

Одним из важнейших предиктивных факторов достижения полного патоморфологического ответа на НАХТ является молодой (<50 лет) возраст пациенток, что показано в ряде проведенных исследований. Также известно, что при ТН РМЖ более молодой возраст пациентов с изначально более высоким содержанием стромальных ИОЛ ассоциировался с лучшими показателями выживаемости [54, 71], субпопуляционный состав при этом не изучался ни в одном исследовании. Но при люминальном раке молочной железы подобных данных найти не удалось, в связи с чем был проведен анализ по выявлению роли возраста пациенток на субпопуляционный состав лимфоидного инфильтрата опухоли. Сначала было определено, что, хотя группы по возрасту были различны в количественном плане (большая часть пациенток, включенных в исследование, имели возраст менее 50 лет), молодой возраст являлся благоприятным фактором достижения RCB 0-1 (33,9% против 7,7%), что было статистически достоверно (p=0,011) (Таблица 29).

**Таблица 29** – Влияние возраста на степень патоморфологического ответа после НАХТ у пациентов с люминальным РМЖ

Возраст			
≤ 50		> 50	
RCB 0-1, n (%)	RCB 2-3, n (%)	RCB 0-1, n (%)	RCB 2-3, n (%)
21 (33,9%)	41 (66,1%)	2 (7,7%)	24 (92,3%)

Затем был проведен анализ по выявлению различий в субпопуляционном составе лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, относительно возраста пациенток. Различий в общем уровне (Me) содержания ИОЛ выявлено не было: 0,9 при молодом возрасте против 0,8 при возрасте более 50 лет ( $p=0,450$ ). Статистически значимых различий в содержании субпопуляций также не выявлено, но наблюдалось численное увеличение содержания клеток с экспрессией CD16+ - естественных киллеров, CD8+CD279+ (CD8+PD1+), а также снижение уровня CD4+CD25+ активированных лимфоцитов в группе пациенток старше 50 лет, что соотносится с данными, полученными ранее (Таблица 30).

**Таблица 30** – Особенности субпопуляционного состава ИОЛ в первичной опухоли люминального РМЖ при различном возрасте пациенток

Субпопуляция	Возраст ≤ 50 лет		Возраст > 50 лет		p
	Me (квартили), %	n	Me (квартили), %	n	
CD3-CD16+CD56+	3,8 (2,2-8,0)	40	4,2 (2,3-9,4)	19	0,638
CD3+CD16+CD56+	7,4 (5,9-8,8)	40	7,8 (6,8-14,4)	18	0,137
CD4+CD25+	9,1 (4,6-12,8)	32	8,0 (5,4-9,6)	14	0,262
CD8+CD279+	10,7 (5,6-20,2)	37	14,6 (6,0-20,3)	15	0,657
CD8+CD16+	2,2 (1,8-5,1)	14	3,7 (2,1-9,4)	8	0,267
CD16+Perforin+	1,4 (1,1-4,3)	13	2,9 (2,2-4,8)	7	0,588
CD16+	6,1 (3,7-14,2)	13	8,7 (3,9-10,7)	7	0,817

При проведении регрессионного однофакторного анализа было выявлено, что предикторами достижения лучшего патоморфологического ответа являлись: отсутствие поражения регионарных лимфоузлов (N 0), G3, возраст  $\leq 50$  лет, рецепторы прогестерона менее 20%, CD8+CD279+  $\leq Me$ , CD4+CD25+  $> Me$  (Таблица 31).

**Таблица 31** – Предикторы полного ответа на НАХТ. Однофакторный регрессионный анализ

Однофакторный анализ				
Фактор	ОР	95% ДИ		p
T 1-2	1,059	0,356	3,147	0,918
T 3-4				
N 0	4,167	1,011	17,175	0,048
N +				
G 1-2	0,161	0,049	0,527	0,003
G 3				
$\leq 50$ лет	5,890	1,266	27,411	0,024
$> 50$ лет				
Ki67 $\leq 40$	0,308	0,094	1,009	0,052
Ki67 $> 40$				
ПП $\leq 20\%$	3,626	1,149	11,448	0,028
ПП $> 20\%$				
CD8+CD279+ $\leq Me$	1,116	1,017	1,224	0,020
CD8+CD279+ $> Me$				
CD3-CD16+CD56+ $\leq Me$	1,191	0,999	1,420	0,052
CD3-CD16+CD56+ $> Me$				
CD4+CD25+ $\leq Me$	0,816	0,686	0,971	0,022
CD4+CD25+ $> Me$				

Далее был проведен многофакторный регрессионный анализ, включающий показатели, выявленные в однофакторном анализе. Показано, что ни один фактор не явился самостоятельным предиктором достижения RCB 0-1 у больных люминальным раком молочной железы (Таблица 32).

**Таблица 32** – Предикторы полного ответа на НАХТ. Многофакторный регрессионный анализ

Многофакторный анализ				
Фактор	ОР	95% ДИ		p
N 0		0,000		0,999
N +				
G 1-2	0,000	0,000		0,999
G 3				
≤ 50 лет	1,680	0,104	27,177	0,715
> 50 лет				
РП ≤ 20%	0,886	0,045	17,569	0,937
РП > 20%				
CD8+CD279+ ≤ Me	1,181	0,962	1,450	0,113
CD8+CD279+ > Me				
CD4+CD25+ ≤ Me	0,907	0,681	1,209	0,507
CD4+CD25+ > Me				

### **3.3 Сравнение субпопуляционного состава между тройным негативным и люминальным В HER2-негативным раком молочной железы**

С целью выявления различий в иммунологическом профиле нами был проведен сравнительный анализ общего содержания ИОЛ и их субпопуляционного состава при обоих подтипах РМЖ (Таблица 33). В текущий анализ были включены все 179 пациентов (90 с ТН РМЖ, 89 с люминальным В HER2-негативным РМЖ).

**Таблица 33** – Сравнительная характеристика пациентов с ТН и люминальным РМЖ

<b>Характеристика</b>	<b>ТН, %</b>	<b>Люминальный, %</b>
<b>Возраст</b>		
	Средний 49,2 (29-71)	Средний 46,17 (25-70)
≤ 50	57,8	70,8
>50	42,2	29,2
<b>Распространенность</b>		
Операбельный	40	14,6
Местнораспространенный	60	85,4
<b>cT</b>		
T1	1,1	2,2
T2	47,8	22,5
T3	8,9	10,1
T4	42,2	65,2
<b>cN</b>		
0	34	10,1
1	26	40,4
2	20	20,2
3	20	29,2
<b>Стадия</b>		
IIA	21,1	1,1
IIB	14,4	9,0
IIIA	12,2	13,5
IIIB	32,2	47,2
IIIC	20,0	29,2

Средний возраст пациенток в группе ТН РМЖ составил 49,2 года, при люминальном подтипе 46,2 года. Местно-распространенный первично-

неоперабельный статус был у 61% пациентов при ТН РМЖ и 85,4% при люминальном В HER2-негативном РМЖ.

Статистически значимых различий в общем процентном содержании ИОЛ при ТН и люминальном В HER2-негативном РМЖ выявлено не было (3% против 2,6% соответственно,  $p=0,646$ ).

При анализе субпопуляционного состава также не было получено значимых различий среди основных линейных популяций (Таблица 34). Единственная популяция, при которой были получены достоверные различия - CD16+Perforin+: статистически значимое повышение уровня данной популяции при люминальном РМЖ (эффекторные клетки с содержанием внутриклеточного перфорина, что определяет цитотоксический потенциал): 1,0 при ТН и 2,9 при люминальном В HER2-негативном РМЖ.

**Таблица 34** – Различия субпопуляционного состава в группах ТН и люминального РМЖ

Субпопуляция	ТН		Люминальный В		p
	Me (квартили), %	n	Me (квартили), %	n	
CD3-CD16+CD56+	4,5 (2,1-9,8)	55	3,8 (2,2-8,4)	59	0,881
CD3+CD16+CD56+	9,3 (5,7-12,7)	55	7,5 (5,9-10,2)	18	0,301
CD8+CD16+	3,4 (2,2-5,9)	16	2,6 (2,0-7,0)	22	0,609
CD16+Perforin+	1,0 (0,4-1,9)	16	2,9 (1,1-4,6)	20	<b>0,018</b>
CD16+	6,7 (3,5-10,6)	16	6,7 (3,8-10,7)	7	0,789
CD4+CD25+	9,9 (7,9-13,3)	37	8,4 (5,4-12,0)	46	0,069

Принимая во внимание, что при ТН РМЖ частота местно-распространенного первично-неоперабельного РМЖ была ниже, чем при люминальном (60% против 85,4%), был проведен анализ только для пациентов с местно-распространенной формой РМЖ (Таблица 35).

**Таблица 35** – Различия субпопуляционного состава в группах ТН и люминального В HER2-негативного РМЖ при местно-распространенной форме заболевания

Субпопуляция	ТН		Люминальный В		p
	Me (квартили), %	n	Me (квартили), %	n	
CD8+CD28+	11,5 (7,2-16,9)	21	15,4 (10,9-20,1)	35	<b>0,029</b>
CD3+CD16+CD56+	9,4 (5,3-13,9)	31	7,5 (5,9-10,8)	51	0,301
CD8+CD16+	3,6 (1,8-7,7)	8	2,6 (1,9-7,4)	20	0,709
CD16+Perforin+	1,0 (0,4-3,1)	8	2,9 (1,2-4,8)	19	0,147
CD16+	8,9 (3,0-11,2)	8	6,7 (3,9-10,7)	19	0,815
CD4+CD25+	9,3 (7,7-12,8)	19	8,4 (5,5-11,7)	42	0,354
CD4+CD152+	3,9 (2,2-17,9)	5	1,1 (0,7-2,5)	15	<b>0,033</b>

Статистически значимых различий в общем процентном содержании ИОЛ при ТН и люминальном РМЖ выявлено не было (2,54% против 2,66% соответственно,  $p=0,606$ ).

При анализе субпопуляционного состава не было получено значимых различий среди основных линейных популяций. Было выявлено статистически значимое увеличение содержания CD8+CD28+ лимфоцитов в группе люминального В HER2-негативного РМЖ (11,5% при ТН РМЖ против 15,4% при люминальном В HER2-негативном РМЖ,  $p=0,029$ ). Эти клетки несут на себе костимуляторный рецептор CD28+, который служит фактором активации наивных Т-лимфоцитов. Иммуносупрессорной активностью данные клетки не обладают [86].

Также было выявлено значимое увеличение CD4+CD152+ лимфоцитов при ТН РМЖ (3,9% против 1,1% при люминальном РМЖ,  $p=0,033$ ). Данные клетки являются носителями на своей поверхности CTLA-4 рецептора (CD152+). Крайне мало литературных данных по данной субпопуляции у пациентов с раком молочной железы, однако исследование Kaewkangsadan V., 2016 года [33] указывает на возможную клиническую значимость данной популяции

лимфоцитов. В частности, высокая экспрессия CTLA-4 (CD152+) на стромальных лимфоцитах опухолевой ткани РМЖ ассоциировалась с частотой достижения полного патоморфологического ответа.

### **3.4 Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов при раке молочной железы с низкими рецепторами эстрогена (ER-low)**

Особенную группу пациентов составляют те, у кого уровень рецепторов эстрогена определяется в границах от 1% до 10% (общий балл по данным ИГХ – 3). Чаще всего определяется либо сильное окрашивание РЭ, либо полное его отсутствие, что конечно затрудняет изучение случаев с низкой экспрессией РЭ [31]. Согласно мета-анализу, включившему более 16 000 пациентов, только около 5% соответствуют категории ER-low [100]. В целом, распространенность ER-low опухолей варьировала от 3% до 9% [105], однако из-за чрезвычайно высокой заболеваемости раком молочной железы, численная популяция этой подгруппы имеет большое значение. К сожалению, из-за его низкой доли и ограниченных фактических данных о нем, последние рекомендации не содержат подробных описаний и рекомендаций по лечению для этой подгруппы пациентов.

В рекомендациях RUSSCO 2023 года по лечению инвазивного рака молочной железы есть только небольшое уточнение что «Опухоли с содержанием окрашенных на РЭ ядер от 1 до 10% считаются слабopоложительными и отличаются низкой чувствительностью к ГТ», что чаще всего автоматически относит их в группу химиотерапии, и в целом тактика лечения данных пациентов приближена к ТН РМЖ. Однако в ряде исследований сообщалось, что пациентки с низкой экспрессией РЭ также могут извлечь пользу от эндокринной терапии [45].

Учитывая данное «противоречие», нами был проведен анализ субпопуляционного состава лимфоцитов, для поиска возможных иммунологических особенностей, в такой узкой подгруппе пациентов.

Было выделено 6 пациенток с ER-low подтипом опухоли, что составляет 6,7% от всех пациенток с люминальным подтипом РМЖ, включенных в исследование, и 6,6% от пациенток с ТН РМЖ. Учитывая тот факт, что данные пациентки получали курс НАХТ по схеме лечения ТН подтипа и данные пациентки учитывались как тройные негативные в общей статистике, следовательно, и сравнение пациенток будет именно в данных подгруппах.

Статистически значимых различий в общем процентном содержании ИОЛ при ТН и ER-low РМЖ выявлено не было (0,6% против 0,8% соответственно,  $p=0,081$ ).

При анализе было выявлено достоверно значимое различие в содержании CD4+CD25+ активированных лимфоцитов, 8,0% при ER-low и 10,4% при ТН РМЖ ( $p=0,035$ ). Также стоит отметить количественные, но не статистически значимые различия в содержании таких субпопуляций как НК-клеток (11,9% и 4,4% соответственно), НКТ (11,1% и 9,3% соответственно) и В-лимфоцитов (4,6% и 2,0% соответственно) (Таблица 36).

**Таблица 36** – Различия субпопуляционного состава в группах ТН и ER-low РМЖ

Субпопуляция	ER-low РМЖ		ТН РМЖ		p
	Me (квартили), %	n	Me (квартили), %	n	
CD3+CD4+	40,7 (36,6-49,4)	5	47,2 (39,4-51,6)	46	0,361
CD3+CD8+	39,1 (30,1-46,7)	5	40,7 (32,7-50,5)	51	0,576
CD3+	82,4 (70,6-89,4)	6	89,4 (81,0-92,9)	54	0,102
CD8+	42,3 (22,8-48,9)	6	42,8 (34,8-53,4)	51	0,408
CD4+CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-low</sup>	12,2 (4,6-15,6)	4	13,0 (5,9-19,6)	30	0,553
CD3-CD19+	<b>4,6</b> (1,4-12,7)	5	2,0 (0,8-4,5)	46	0,329
CD3-CD16+CD56+	<b>11,9</b> (2,6-14,4)	6	4,4 (2,1-8,8)	50	0,088
CD3+CD16+CD56+	<b>11,1</b> (6,6-15,6)	6	9,3 (5,6-12,6)	50	0,444
CD4+CD25+	8,0 (5,2-8,3)	4	10,4 (8,4-13,5)	34	<b>0,035</b>

CD4+CD279+	13,7 (9,0-21,6)	4	12,7 (10,2-22,0)	36	0,983
CD8+CD279+	16,6 (9,9-25,5)	4	14,4 (7,8-21,8)	36	0,648
CD3-CD8+	2,8 (1,2-3,5)	6	1,8 (1,1-3,2)	51	0,484
CD3+HLA-DR+	12,0 (3,9-13,9)	4	10,7 (2,4-31,0)	30	0,738
CD3-HLA-DR+	5,5 (1,7-13,9)	4	2,8 (0,5-5,0)	30	0,262
HLA-DR+	19,3 (6,3-25,1)	4	19,0 (3,2-36,0)	30	0,699
CD8+CD28+	10,3 (8,6-14,8)	4	12,0 (7,3-19,0)	34	0,697
CD8+CD28-	26,9 (16,8-45,1)	4	32,2 (25,7-39,4)	34	0,535
CD8+CD28+/CD8+CD28-	0,5 (0,2-0,6)	4	0,4 (0,2-0,7)	34	0,982
CD4+/CD8+	1,1 (0,8-1,4)	5	1,1 (0,8-1,6)	40	0,116
11b+28-	28,2 (19,0-33,7)	4	19,7 (13,1-28,5)	31	0,301
11b+28+	10,9 (8,1-16,8)	4	11,8 (8,5-18,3)	31	0,745
11b-28-	36,1 (26,4-56,0)	4	44,4 (36,2-57,6)	31	0,499
11b-28+	21,1 (14,0-29,0)	4	17,6 (7,8-29,4)	32	0,645
CD8+CD4+	6,9 (3,1-10,9)	4	3,4 (1,9-5,7)	47	0,131
CD4+CD152+	25,1	1	3,2 (1,2-10,7)	7	0,500

Интерпретировать полученные данные в рамках нашей работы представляется сложной задачей, но у нас получилось предположить причину и теоретически обосновать полученные результаты.

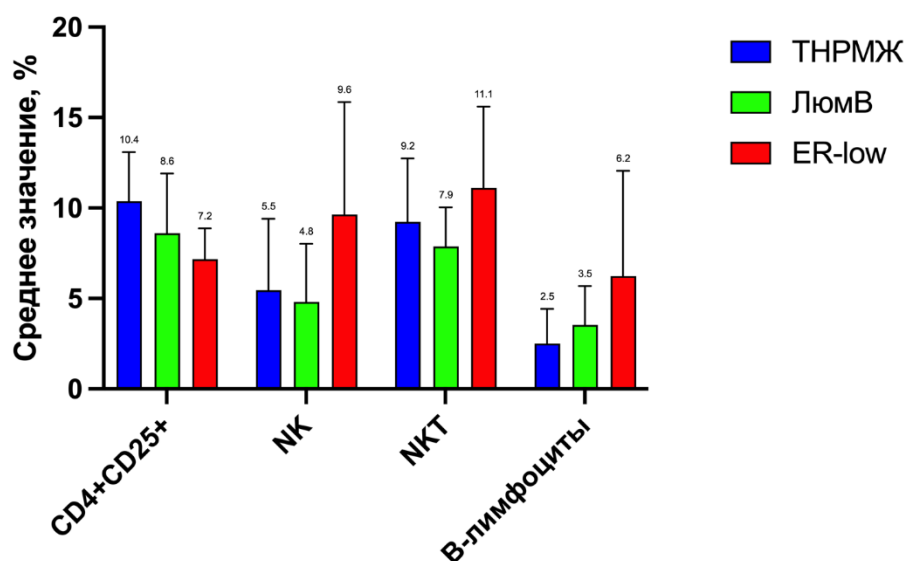
Большинство современных исследований приходит к выводу что ER-low опухоли молочной железы сходны с ТН РМЖ по своему молекулярному ландшафту, клинико-патологическим характеристикам, прогнозу и ответу на терапию. Тем не менее, часть из них может сохранять некоторую степень зависимости от передачи сигналов РЭ, и нельзя полностью исключать возможность того, что они в какой-то степени реагируют на эндокринную терапию [29, 52]. По результатам данных работ уровни достижения pCR в группах ER-low и ТН РМЖ схожи и значительно отличаются от люминального РМЖ. По данным нашей работы мы получили отличные результаты (Таблица 37).

**Таблица 37** – Патоморфологический регресс в зависимости от подтипа опухоли (ТН РМЖ против ER-low)

Подтип	pCR, %	Не pCR, %
ТН РМЖ	52,9	47,1
ER-low	16,7	83,3

Конечно, никто не уделял внимания субпопуляционному составу иммунокомпетентных клеток, а использовались лишь общее содержание ИОЛ в опухоли, чаще всего оцененным ИГХ-методом. Лишь некоторые небольшие работы позволяют нам опираться в обосновании полученных данных.

CD4+CD25+ клетки и В-лимфоциты как известно являются иммуносупрессорными [13], снижая эффективность борьбы собственного иммунитета против опухоли, теоретически снижая частоту полных патоморфологических ответов на НАХТ. Можно предположить, что их уровень у пациентов с ER-low подтипом при сравнении с ТН РМЖ будет выше, однако в нашей работе полученные данные не сходятся с данным предположением. То же касается регуляторных НКТ-клеток, задача которых в регуляции иммунного ответа, как снижая, так и повышая противоопухолевый потенциал, в том числе и цитотоксических НК-клеток (Рисунок 4).



**Рисунок 4** – Сравнение субпопуляций при разных подтипах РМЖ

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### 4.1 Обсуждение субпопуляционного состава инфильтрирующих опухоль лимфоцитов при тройном негативном раке молочной железы

В нашем исследовании мы проанализировали данные 90 пациенток с тройным негативным раком молочной железы. Медиана возраста составила 49 лет, а большинство пациенток имели поражение регионарных лимфатических узлов (66%), что указывает на высокую степень распространенности заболевания. У 60% пациенток был диагностирован местно-распространенный первично-неоперабельный процесс (T3-4 и/или N2/N3). Частота герминальных мутаций в генах BRCA1/2 составила 16,7%, что согласуется с данными литературы о частоте этих мутаций у пациенток с ТН РМЖ.

Все пациентки получили планируемые 4 курса неoadъювантной химиотерапии по схеме доксорубицин + циклофосфамид с последующим блоком паклитаксел + карбоплатин. Важно отметить, что отмен курсов не было, а средняя дозоинтенсивность составила 95%, что свидетельствует о хорошей переносимости назначенной химиотерапии и высокой приверженности пациенток к лечению. Хирургическое вмешательство было выполнено у всех пациенток, 35,5% из них было проведено органосохраняющее вмешательство, а 64,5% – мастэктомия. Полный патоморфологический ответ (RCB 0) был достигнут у 51,1% пациенток, что подтверждает высокую эффективность данной схемы НАХТ при ТН РМЖ.

Анализ субпопуляционного состава ИОЛ до начала лечения включал оценку 31 субпопуляции, включая минорные, а также соотношение CD4+/CD8+ и CD8+CD28+/CD8+CD28-. Среднее процентное содержание ИОЛ в опухоли составило 3%, а максимальное 29,7%, что является низким показателем в сравнении с иммуногистохимическим методом оценки ИОЛ, где границей от низкого до высокого уровня содержания только стромальных лимфоцитов находится в диапазоне от <10% до >60%. Медиана содержания ИОЛ в группах с полным (RCB 0) и неполным патоморфозом статистически значимо не

различалась ( $p=0,271$ ), что указывает на то, что общее содержание ИОЛ не является предиктором полного ответа на НАХТ по данным нашего исследования, что в целом отличается от мировых результатов. Данный вывод можно объяснить вероятными ограничениями методики цитофлуориметрии, основной целью которой стало выявление конкретных субпопуляций в клеточной взвеси. Также возможно необходимо снижение размерности подсчетов, и общий процент не является идеальным показателем оценки уровня ИОЛ при использовании данной методики.

Интересные результаты были получены при анализе субпопуляций CD8+CD279+ и CD8+CD28-. Было выявлено, что высокая инфильтрация опухоли CD8+CD279+ лимфоцитами (более 18,6%) потенциально ассоциировалась с большей частотой достижения полного патоморфологического ответа, хотя различия не достигли статистической значимости ( $p=0,152$ ). Эти данные подчеркивают важность дальнейшего изучения роли данной субпопуляции в ответе на НАХТ при ТН РМЖ.

Неожиданно высокая частота полного патоморфологического ответа была отмечена у пациенток с высоким уровнем инфильтрации CD8+CD28- клетками (72,2% против 26,3% в подгруппе с низким содержанием,  $p=0,005$ ). CD8+CD28- Т-клетки представляют собой уникальную субпопуляцию регуляторных Т-клеток, которые играют важную роль в иммунном окружении рака молочной железы. Эти клетки характеризуются отсутствием ко-стимулирующей молекулы CD28, которая обычно необходима для активации и выживания Т-клеток. Повышенные уровни CD8+CD28- ассоциируются с иммуносупрессией в микроокружении опухоли, что способствует прогрессированию опухоли и устойчивости к иммуно/химиотерапии [27, 42]. Исследования показали, что более высокая доля этих клеток коррелирует с худшей безрецидивной и общей выживаемостью у пациентов, получающих адаптивную Т-клеточную иммунотерапию. В частности, с более чем 24,2% CD8+CD28- в периферической крови медиана времени до прогрессирования и общая выживаемость были значительно ниже по сравнению с теми, у кого доля этих клеток была меньше [110, 85]. В нашем исследовании

высокий уровень инфильтрации CD8+CD28- клетками ассоциировался с более благоприятными исходами при ТН РМЖ несмотря на то, что в литературе данные клетки часто ассоциируются с ухудшением прогноза при метастатическом раке молочной железы. Это несоответствие может быть связано с различиями в биологическом поведении раннего ТН РМЖ и метастатического рака, что требует дальнейшего изучения.

Мы обнаружили, что у пациенток с высоким уровнем инфильтрации CD3+CD16+CD56+, наблюдалась тенденция к лучшему патоморфологическому ответу. Эти клетки обладают уникальными свойствами, позволяющими им быстро реагировать на опухолевые антигены и активировать другие компоненты иммунной системы, такие как дендритные клетки, Т-лимфоциты и натуральные киллерные клетки (NK-клетки) [72, 128]. В частности, пациентки с инфильтрацией НКТ-клетками выше медианного уровня достигали полного патоморфологического ответа в 63% случаев, тогда как у пациенток с низким уровнем этот показатель составлял всего 35,7%, хотя данные и не достигли статистической достоверности ( $p=0,091$ ).

Эти результаты согласуются с данными других исследований, которые подчеркивают важность НКТ-клеток в иммунном надзоре и их способность модулировать опухолевое микроокружение, уменьшая его иммуносупрессивные свойства. Высокий уровень НКТ-клеток может указывать на более активный и эффективный иммунный ответ, способный лучше контролировать и уничтожать опухолевые клетки [76].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важности изучения субпопуляционного состава ИОЛ для прогноза ответа на НАХТ при ТН РМЖ. Высокий уровень инфильтрации опухоли CD8+CD279+ и CD8+CD28- клетками может служить маркером благоприятного ответа на лечение. Эти результаты подчеркивают необходимость дальнейших исследований для углубленного понимания роли различных субпопуляций ИОЛ в патогенезе и ответе на лечение ТН РМЖ, что может способствовать разработке новых терапевтических стратегий

и улучшению клинических исходов у пациенток с данным подтипом рака молочной железы.

#### **4.2 Обсуждение субпопуляционного состава инфильтрирующих опухоль лимфоцитов при люминальном В раке молочной железы**

В нашем исследовании люминального рака молочной железы были проанализированы данные 89 пациенток, средний возраст которых составил 46 лет. Большинство пациенток (85,4%) имели местно-распространенный первично-неоперабельный процесс (T4 и/или N2-3).

Все пациентки получили планируемые 4 курса неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) по схеме доксорубицин + циклофосфамид с последующим блоком 4 курса доцетаксела. Средняя дозоинтенсивность составила 96%. Хирургическое вмешательство было выполнено у 87 пациенток, и полный патоморфологический ответ (RCB 0) был достигнут у 15,7% пациенток, что указывает на меньшую чувствительность люминального РМЖ к НАХТ по сравнению с ТН РМЖ. При объединении групп RCB 0 и RCB 1 частота полного или почти полного патоморфологического ответа составляла 25,8%, что несколько улучшает общую картину эффективности НАХТ при люминальном РМЖ. Это объединение обусловлено отсутствием достоверных различий в отдаленных результатах между группами RCB 0 и RCB 1, что подтверждается данными литературы о том, что для люминального РМЖ достижение RCB 1 также может свидетельствовать о хорошем прогнозе.

Анализ субпопуляционного состава ИОЛ до начала лечения включал оценку 31 субпопуляции. Среднее процентное содержание ИОЛ в опухоли составило 2,58%. Общее содержание ИОЛ в группах с полным и неполным патоморфозом статистически значимо не различалось ( $p=0,137$ ).

Интересные результаты были получены при анализе субпопуляций CD4+CD25+ и CD8+CD279+. Было выявлено, что высокий уровень CD4+CD25+ лимфоцитов ассоциировался с лучшими результатами лечения. Пациентки с

высоким уровнем этой субпопуляции имели значительно более высокую частоту полного патоморфологического ответа (57,1% против 8,3% в подгруппе с низким содержанием CD4+CD25+,  $p=0,001$ ). Напротив, высокий уровень инфильтрации CD8+CD279+ лимфоцитами ассоциировался с худшими результатами лечения (12,0% против 46,2% в подгруппе с низким содержанием CD8+CD279+,  $p=0,007$ ). Эти данные указывают на негативное влияние данной субпопуляции на прогноз и подчеркивают важность дальнейшего изучения их роли в патогенезе люминального РМЖ.

Дополнительно, мы провели анализ субпопуляционного состава ИОЛ в зависимости от возраста пациенток, так как возраст является важным фактором, влияющим на иммунный ответ и прогноз заболевания. Мы обнаружили, что более молодой возраст пациенток (менее 50 лет) ассоциировался с более высоким уровнем инфильтрации CD4+CD25+ лимфоцитами и, соответственно, с лучшими результатами лечения. В то же время, у пациенток старшего возраста (более 50 лет) наблюдалось увеличение содержания CD8+CD279+ лимфоцитов, что ассоциировалось с худшими исходами. Это может указывать на возрастные изменения в иммунном ответе, влияющие на эффективность НАХТ при люминальном РМЖ.

Таким образом, высокий уровень CD4+CD25+ лимфоцитов может служить маркером благоприятного ответа на лечение, в то время как высокий уровень CD8+CD279+ лимфоцитов ассоциируется с неблагоприятным прогнозом.

#### **4.3 Обсуждение субпопуляционного состава инфильтрирующих опухоль лимфоцитов при тройном негативном раке молочной железы в сравнении с люминальным В HER2-негативным раке молочной железы**

В нашем исследовании мы провели сравнительный анализ субпопуляционного состава ИОЛ у пациенток с тройным негативным раком молочной железы и люминальным В. Всего было проанализировано 179 пациенток: 90 с ТН РМЖ и 89 с люминальным РМЖ. Одним из ключевых

моментами нашего исследования стало изучение общего содержания ИОЛ и их субпопуляционного состава. Не было выявлено статистически значимых различий в общем процентном содержании ИОЛ между группами ТН и люминального РМЖ (3% против 2,6%,  $p=0,646$ ). Этот результат указывает на то, что общее содержание ИОЛ само по себе не является достаточно информативным маркером для дифференциации подтипов РМЖ и предсказания ответа на лечение.

Однако при анализе субпопуляционного состава ИОЛ были выявлены некоторые интересные различия. Например, уровень CD16+Perforin+ клеток, которые являются эффекторными клетками с высоким цитотоксическим потенциалом, был значимо выше у пациенток с люминальным РМЖ (29% против 10% у пациенток с ТН РМЖ,  $p=0,018$ ). Это может свидетельствовать о более активной цитотоксической активности в опухолях люминального подтипа, что, возможно, компенсирует меньшую общую инфильтрацию ИОЛ.

Важным аспектом стало сравнение субпопуляций ИОЛ, которые могут иметь предиктивное значение. В нашем исследовании высокий уровень инфильтрации CD4+CD25+ клетками был связан с лучшими результатами лечения при обоих подтипах РМЖ, хотя более выражен этот эффект был у пациенток с люминальным РМЖ. В группе ТН РМЖ высокий уровень CD4+CD25+ также ассоциировался с благоприятными исходами, но разница была менее выраженной. Это подтверждает данные литературы о важной роли регуляторных Т-клеток в контроле опухолевого роста и их потенциале в качестве терапевтической мишени. С другой стороны, высокий уровень инфильтрации CD8+CD279+ клетками ассоциировался с худшими результатами лечения при обоих подтипах РМЖ. Особенно ярко этот эффект проявился у пациенток с люминальным РМЖ.

Что касается исследования ER-low подтипа РМЖ, в полученных нами результатах ER-low подтип опухоли имеет схожий с ТН РМЖ профиль цитотоксической активности за счет увеличения содержания НК-клеток, в то же время снижение содержания CD4+CD25+ может свидетельствовать о угнетении супрессорной функции лимфоцитов опухоли, что вкуче должно обеспечивать

достижение полных патоморфозов не менее чем при ТН РМЖ, однако в нашем исследовании мы этого не наблюдаем. Судя по всему, именно увеличение содержания В-лимфоцитов оказывает снижение цитотоксического потенциала в данной популяции больных, что требует дальнейшего изучения на большем количестве образцов.

## ВЫВОДЫ

1. Общий уровень инфильтрации опухоли ИОЛ и содержание большинства их субпопуляций, схожи между пациентами с тройным негативным, люминальным HER2-негативным и ER-low подтипами РМЖ. Однако при ER-low РМЖ содержание CD4+CD25+ лимфоцитов оказалось ниже, чем при ТН, что указывает на менее выраженный регуляторный иммунный ответ. При люминальном подтипе отмечено повышение уровней CD16+Perforin+ и CD8+CD28+ лимфоцитов, что отражает биологические различия в иммунной активности между подтипами.

2. Высокие уровни CD8+CD28- и CD8+CD279+ лимфоцитов связаны с более высокой вероятностью достижения полного патоморфологического ответа у пациентов с ТН РМЖ. В люминальном HER2-негативном подтипе высокий уровень CD4+CD25+ лимфоцитов ассоциировался с более высокой частотой достижения полного или почти полного патоморфологического ответа. В то же время, низкий уровень CD3+CD16+CD56+ лимфоцитов при ТН РМЖ увеличивал риск недостижения полного патоморфологического ответа.

3. Субпопуляции CD8+CD28- и CD8+CD279+ лимфоцитов показали наибольшую значимость как предикторы полного ответа. Например, сочетание высоких уровней CD8+CD279+ и CD3+CD16+CD56+ лимфоцитов (>Me) предсказывало достижение RCB 0 в 87,5% случаев при ТН РМЖ. Это подчеркивает ключевую роль активационных и эффекторных лимфоцитов в противоопухолевом иммунном ответе при ТН РМЖ.

4. Индивидуальный субпопуляционный состав лимфоцитов, включая CD8+CD28-, CD8+CD279+, и CD3+CD16+CD56+, может быть использован для прогнозирования исходов лечения и выбора персонализированных стратегий терапии.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения точности прогнозирования ответа на неоадьювантную химиотерапию рекомендуется дополнить стандартное исследование уровня опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии с оценкой конкретных субпопуляций:

1.1. для трижды негативного РМЖ (ТН РМЖ): CD8+CD28-, CD8+CD279+ и CD3+CD16+CD56+;

1.2. для люминального В HER2-негативного РМЖ: CD4+CD25+ и CD8+CD279+;

2. при планировании дальнейших исследований рекомендуется использовать следующие комбинации ОИЛ для стратификации пациентов ТН РМЖ до начала лечения:

2.1. CD8+CD279+ и CD3+CD16+CD56+ выше и ниже медианных значений.

3. Рекомендуется учитывать биологический подтип опухоли при интерпретации уровня экспрессии CD8+CD279+ (PD-1+ клеток), так как их прогностическое значение диаметрально противоположно при ТН и ЭР+ РМЖ:

3.1. у пациенток с люминальным В HER-2 негативным РМЖ высокий уровень этой субпопуляции следует рассматривать как фактор резистентности к проводимой терапии (снижение частоты полных ответов с 46,2% до 12%). Это может служить основанием для более тщательного мониторинга в процессе НАХТ или рассмотрения альтернативных схем лечения;

3.2. у пациенток с ТН РМЖ, напротив, этот маркер ассоциирован с более благоприятным ответом.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АХТ — адъювантная химиотерапия

ВБП — выживаемость без прогрессирования

Г-КСФ — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ДИ — доверительный интервал

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГХ — иммуногистохимия

ИОЛ — инфильтрирующие опухоль лимфоциты

ИТ — иммунотерапия

ЛТ — лучевая терапия

НАХТ — неoadъювантная химиотерапия

ОАМ — опухоль-ассоциированные макрофаги

ОВ — общая выживаемость

ОР — отношение рисков

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РМЖ — рак молочной железы

РП — рецепторы прогестерона

РЭ — рецепторы эстрогена

ТН РМЖ — тройной негативный рак молочной железы

ЭТ — эндокринотерапия

BRCA1/2 — гены, ассоциированные с раком молочной железы и яичников (Breast Cancer genes 1 and 2)

CD — кластер дифференцировки (Cluster of Differentiation)

ER — эстрогеновые рецепторы (Estrogen Receptors)

ER-low — низкая экспрессия эстрогеновых рецепторов

FISH — флуоресцентная гибридизация in situ (Fluorescence In Situ Hybridization)

HER2 — Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Человеческий эпидермальный фактор роста рецептор 2)

MHC — главный комплекс гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex)

NGS — высокопроизводительное секвенирование (Next-Generation Sequencing)

pCR — Pathologic complete response (Полный патоморфологический ответ)

PD-L1 — лиганд программируемой смерти 1

RCB — Residual Cancer Burden (Остаточная опухолевая нагрузка)

Th — Т-хелперы (T-helper cells)

TMB — мутационная нагрузка опухоли (Tumor Mutational Burden)

Treg — регуляторные Т-клетки (Regulatory T cells)

VEGF — фактор роста эндотелия сосудов

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты: биологическая суть и клиническое значение при раке молочной железы / М.Б. Стенина, Е.В. Царева, А.А. Жаров, С.А. Тюляндин // Российский онкологический журнал. – 2016. – Т. 21. – № 1–2. – С. 92–100.
2. Практические рекомендации по лекарственному лечению инвазивного рака молочной железы / М.Б. Стенина, Л.Г. Жукова, И.А. Королева [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т. 9. – № 3S2. – С. 128–163.
3. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / под ред. АД. Каприна, В. В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – 239 с.
4. A Distinct Macrophage Population Mediates Metastatic Breast Cancer Cell Extravasation, Establishment and Growth / B. Qian, Y. Deng, J. H. Im [et al.] // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4. – № 8. – P. e6562.
5. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study / S. Loibl, M. Untch, N. Burchardi [et al.] // Annals of Oncology. – 2019. – Vol. 30. – P. 1279–1288.
6. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer / P. Farmer, H. Bonnefoi, P. Anderle [et al.] // Nature Medicine. – 2009. – Vol. 15. – № 1. – P. 68–74.
7. Abstract GS1-01: increasing the dose density of adjuvant chemotherapy by shortening intervals between courses or by sequential drug administration significantly reduces both disease recurrence and breast cancer mortality: an EBCTCG meta-analysis of 21,000 women in 16 randomised trials / R. Gray, R. Bradley, J. Braybrooke [et al.] // Cancer Research. – 2018. – Vol. 78. – № 4. Supplement. – C. GS1-01-GS1-01.
8. Abstract PD13-11: PD13-11 final overall survival analysis of Monarch 2: a phase 3 trial of abemaciclib plus fulvestrant in patients with hormone receptor-positive,

HER2-negative advanced breast cancer / A. Llombart-Cussac, G. Sledge, T. Masakazu [et al.] // *Cancer Research*. – 2023. – Vol. 83. – № 5. Supplement. – C. PD13-11-PD13-11.

9. Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial / S. Loibl, J. O'Shaughnessy, M. Untch [et al.] // *The lancet oncology*. – 2018. – Vol. 19. – № 4. – C. 497–509.

10. Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy / N. Masuda, S.J. Lee, S. Ohtani [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Vol. 376. – № 22. – P. 2147–2159.

11. Adjuvant dose-dense chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized trials / F. Petrelli, M. Cabiddu, A. Coiu [et al.] // *Breast Cancer Res Treat*. – 2015. – Vol. 151. – № 2. – P. 251–259.

12. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response / Y. Godet, E. Fabre, M. Dosset [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2012. – Vol. 18. – № 10. – P. 2943–2953.

13. Antony, P. A. CD4+CD25+ T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2 / P.A. Antony, N.P. Restifo // *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*. – 2005. – Vol. 28. – № 2. – P. 120–128.

14. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients / H.R. Ali, E. Provenzano, S.J. Dawson [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2014. – Vol. 25. – № 8. – P. 1536–1543.

15. Association of stromal tumour-infiltrating lymphocytes with recurrence-free survival in the N9831 adjuvant trial in patients with early-stage HER2+ breast cancer / E.A. Perez, K.V., Ballman, K.S. Tenner [et al.] // *JAMA Oncol*. – 2016. – Vol. 2. – P. 56–64.

16. Association of tumour-infiltrating lymphocytes with distant disease-free survival in the ShortHER randomized adjuvant trial for patients with early HER2+

breast cancer / M.V. Dieci, P. Conte, G. Bisagni [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2019. – Vol. 30. – P. 418–423.

17. Bone marrow-derived stromal cells express lineage-related messenger RNA species / N.C. Direkze, R. Jeffery, K. Hoidal-Dilke [et al.] // *Cancer Res*. – 2006. – Vol. 66. – № 3. – P. 1265–1269.

18. Borderline ER-positive primary breast cancer gains no significant survival benefit from endocrine therapy: a systematic review and meta-analysis / T. Chen, N. Zhang, M.S. Moran [et al.] // *Clinical breast cancer*. – 2018. – T. 18. – № 1. – С. 1–8.

19. Bos, R. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes / R. Bos, L.A. Sherman // *Cancer Res*. – 2010. – Vol. 70. – № 21. – P. 8368–8377.

20. Breast Cancer Statistics. – Текст электронный / *Cancer.net* : сайт. – 2025. – URL: <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/statistics> (дата обращения: 19.12.2025).

21. Breast Cancer, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology / W.J. Gradishar, B.O. Anderson, J. Abraham [et al.] // *J Natl Compr Canc Netw*. – 2020. – Vol. 18. – № 4. – P. 452–478.

22. Burugu, S. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication / S. Burugu, K. Asleh-Aburaya, T. O. Nielsen // *Breast Cancer*. – 2016. – Vol. 24. – № 1. – P. 3–15.

23. Cancer-immune interactions in ER-positive breast cancers: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes / M. Sobral-Leite, I. Salomon, M. Opdam [et al.] // *Breast Cancer Res*. – 2019. – Vol. 21. – P. 90.

24. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival / C. Gu-Trantien, S. Loi, S. Garaud S [et al.] // *J Clin Invest*. – 2013. – Vol. 123. – № 7. – P. 2873–2892.

25. CD8(+) T lymphocytes infiltrating breast cancer: A promising new prognostic marker? / S. Mahmoud, A. Lee, I. Ellis [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2012. – Vol. 1. – № 3. – P. 364–365.

26. Chen, D.S. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point / D.S. Chen, I. Mellman // *Nature*. – 2017. – Vol. 541. – № 7637. – P. 321–330.
27. Circulating CD8+CD28- suppressor T cells tied to poorer prognosis among metastatic breast cancer patients receiving adoptive T-cell therapy: A cohort study / Q. Song, J. Ren, X. Zhou [et al.] // *Cytotherapy*. – 2018. – Vol. 20. – № 1. – P. 126–133.
28. Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up / F.L. Schneiders, R.C.G. de Bruin, A.J.M. van den Eertwegh [et al.] // *J Clin Oncol*. – 2012. – Vol. 30. – № 5. – P. 567–570.
29. Clinical implication of low estrogen receptor (ER-low) expression in breast cancer / T. Reinert, F. Cascelli, C.A.A. de Resende [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1015388.
30. Coldman, A.J. Impact of dose-intense chemotherapy on the development of permanent drug resistance / A.J. Coldman, J.H. Goldie // *Semin Oncol*. – 1987. – Vol. 14, Suppl. 4. – P. 29–33.
31. Collins, L.C. Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining results in breast cancer: an analysis of 825 cases / L.C. Collins, M.L. Botero, S.J. Schnitt // *American journal of clinical pathology*. – 2005. – Vol. 123. – № 1. – P. 16–20.
32. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomized trials / K. Albain, S. Anderson, R. Arriagada [et al.] // *Lancet*. – 2012. – Vol. 379. – № 9814. – P. 432–444.
33. Crucial Contributions by T Lymphocytes (Effector, Regulatory, and Checkpoint Inhibitor) and Cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a Pathological Complete Response Induced by Neoadjuvant Chemotherapy in Women with Breast Cancer / V. Kaewkangsan, C. Verma, J. M. Eremin [et al.] // *J. Immunol Res*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 4757405.
34. Cytokines secreted by macrophages isolated from tumor microenvironment of inflammatory breast cancer patients possess chemotactic properties / M.M.

Mohamed, E.A. El-Ghonaimy, M.A. Nouh [et al.] // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2014. – Vol. 46. – P. 138–147.

35. Da Cunha, A. Pattern response of dendritic cells in the tumor microenvironment and breast cancer / A. Cunha, M.A. Michelin, E.F. Murta // *World Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 5. – № 3. – P. 495.

36. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017 / G. Curigliano, H. Burnstein, E. Weiner [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2017. – Vol. 28. – № 8. – P. 1700–1712.

37. Dhodapkar, M.V. Type II NKT cells and their emerging role in health and disease / M.V. Dhodapkar, V. Kumar // *J Immunol*. – 2017. – Vol. 198. – № 3. – P. 1015–1021.

38. Does dose-dense neoadjuvant chemotherapy have clinically significant prognostic value in breast cancer?: A meta-analysis of 3,724 patients / Y. Ding, K. Ding, H. Yang [et al.] // *PLoS One*. – 2020. – Vol. 15. – № 5. – P. e0234058.

39. Dose-Dense chemotherapy in nonmetastatic breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / L. Bonilla, I. BenAharon, L. Vidal [et al.] // *J Natl Cancer Inst*. – 2010. – Vol. 102. – № 24. – P. 1845–1854.

40. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up / S. Loibl, F. André, T. Bachelot [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2023. – Vol. 34. – № 3. – P. 259–283.

41. Early Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines / F. Cardoso, S. Kyriakides, S. Ohno [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2019. – Vol. 30. – P. 1194–1220.

42. Elevated level of peripheral CD8(+)CD28(-) T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy / G. Song, X. Wang, J. Jia [et al.] // *Cancer Immunol Immunother*. – 2013. – Vol. 62. – № 6. – P. 1123–1130.

43. Ellery, J.M. Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction / J.M. Ellery, P.J. Nicholls // *Immunol Cell Biol*. – 2002. – Vol. 80. – № 4. – P. 351–357.

44. Emens, L.A. Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade / L.A. Emens // *Expert Rev Anticancer Ther.* – 2012. – Vol. 12. – № 12. – P. 1597–1611.
45. Estrogen receptor-low breast cancer: biology chaos and treatment paradox / K.-D. Yu, Y.W. Cai, S.Y. Wu [et al.] // *Cancer Communications.* – 2021. – Vol. 41. – № 10. – P. 968–980.
46. Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis / Z. Zhang, C. Ni, W. Chen [et al.] // *BMC Cancer.* – 2014. – Vol. 14. – № 1. – P. 49.
47. Fibroblast-recruited, tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup> T-cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signaling / W. Tan, W. Zhang, A. Strasner [et al.] // *Nature.* – 2011. – Vol. 470. – P. 548–553.
48. Flow cytometric identification of tumor-infiltrating lymphocytes from glioblastoma / K. Woroniecka, P. Chongsathidkiet, A. Elsamadicy [et al.] // *Glioblastoma: Methods and Protocols.* – 2018. – P. 221–226.
49. Functional differences between low- and high-affinity CD8(+) T cells in the tumor environment / R. Bos, K.L. Marquardt, J. Cheung [et al.] // *Oncoimmunology.* – 2012. – Vol. 1. – № 8. – P. 1239–1247.
50. Hanahan, D. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment / D. Hanahan, L.M. Coussens // *Cancer Cell.* – 2012. – Vol. 21. – № 3. – P. 309–322.
51. Heritability of Mammographic Density, a Risk Factor for Breast Cancer / N.F. Boyd, G.S. Dite, J. Stone [et al.] // *New England Journal of Medicine.* – 2002. – Vol. 347. – № 12. – P. 886–894.
52. Immune landscape of breast tumors with low and intermediate estrogen receptor expression / L. Voorwerk, J. Sanders, M.S. Keusters [et al.] // *NPJ Breast Cancer.* – 2023. – Vol. 9. – P. 39.
53. Immunotyping and Quantification of Melanoma Tumor-Infiltrating Lymphocytes / Max O. Meneveau, Z.T. Sahli, K.T. Lynch [et al.] // *Melanoma: Methods and Protocols.* – 2021. – P. 515–528.

54. Impact of age on pathological complete response and locoregional recurrence in locally advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy / H.H. Chou, W.L. Kuo, C.C. Yu [et al.] // *Biomedical Journal*. – 2019. – Vol. 42. – № 1. – P. 66–74.

55. Increasing the dose intensity of chemotherapy by more frequent administration or sequential scheduling: a patient-level meta-analysis of 37 298 women with early breast cancer in 26 randomised trials / Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) // *The lancet*. – 2019. – Vol. 393. – № 10179. – P.1440–1452.

56. Intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer / E. Sato, S.H. Olson, J. Ahn [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – Vol. 102. – № 51. – P. 18538–18543.

57. Korkaya, H. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment / H. Korkaya, S. Liu, M.S. Wicha // *Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – Vol. 121. – № 10. – P. 3804–3809.

58. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy / D.G. DeNardo, D.J. Brennan, E. Rexhepaj [et al.] // *Cancer Discov*. – 2011. – Vol. 1. – № 1. – P. 54–67.

59. Leukocyte composition of human breast cancer / B. Ruffell, A. Au, H.S. Rugo [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – Vol. 109. – P. 2796–2801.

60. Lotze, M.T. Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer / M.T. Lotze // *Annals of Surgery*. – 1997. – Vol. 226. – P. 1–5.

61. Macrophage phenotypic subtypes diametrically regulate epithelial-mesenchymal plasticity in breast cancer cells / M. Yang, B. Ma, H. Shao [et al.] // *BMC Cancer*. – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 419.

62. Mammographic density—a review on the current understanding of its association with breast cancer / C.W. Huo, G.L. Chew, K.L. Britt [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2014. – Vol. 144. – № 3. – P. 479–502.

63. Marchiò, C. Adenoid cystic carcinomas of the breast and salivary glands (or 'The strange case of Dr Jekyll and Mr Hyde' of exocrine gland carcinomas) / C. Marchiò, B. Weigelt, J.S. Reis-Filho // *J Clin Pathol.* – 2010. – Vol. 63. – P. 220–228.
64. Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series / M.A.A.K. Folgueira, S. Maistro, M.L.H. Katayama [et al.] // *Bioscience Reports.* – 2013. – Vol. 33. – № 6. – P. 921–929.
65. Martinez-Outschoorn, U.E. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth / U.E. Martinez-Outschoorn, M.P. Lisanti, F. Sotgia // *Semin Cancer Biol.* – 2014. – Vol. 25. – P. 47–60.
66. Melief, C.J.M. Cancer Immunotherapy by Dendritic Cells / C.J.M. Melief // *Immunity.* – 2008. – Vol. 29. – № 3. – P. 372–383.
67. Molecular portraits of human breast tumours / C.M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 406. – № 6797. – P. 747–752.
68. Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2 / L.S. Metelitsa, H.W. Wu, H. Wang [et al.] // *J Exp Med.* – 2004. – Vol. 199. – № 9. – P. 1213–1221.
69. NCCN Guidelines Version 4.2024 Breast Cancer. – National Comprehensive Cancer Network, 2024.
70. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial / E.A. Mittendorf, H. Zhang, C.H. Barrios [et al.] // *Lancet.* – 2020. – Vol. 396. – № 10257. – P. 1090–1100.
71. Neoadjuvant Chemotherapy and Nodal Response Rates in Luminal Breast Cancer: Effects of Age and Tumor Ki67 / J.C. Boughey, J.C. Boughey, T.L. Hoskin [et al.] // *Annals of Surgical Oncology.* – 2022. – Vol. 29. – № 9. – P. 5747–5756.

72. Neoantigen Identification and Dendritic Cell-Based Vaccines for Lung Cancer Immunotherapy / K. Kumari, A. Singh, A. Chaudhary [et al.] // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12. – № 5. – P. 498.

73. O'Meara, T.A. Tumor mutational burden as a predictor of immunotherapy response in breast cancer / T.A. O'Meara, S.M. Tolaney // *Oncotarget*. – 2021. – Vol. 12. – P. 394–400.

74. OlympiAD extended follow-up for overall survival and safety: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer / M.E. Robson, S.A. Im, E. Senkus [et al.] // *European Journal of Cancer*. – 2023. – Vol. 184. – P. 39–47.

75. Overall survival in the OlympiA phase III trial of adjuvant olaparib in patients with germline pathogenic variants in BRCA1/2 and high-risk, early breast cancer / C.E. Geyer Jr., J.E. Garber, R.D. Gelber [et al.] // *Annals of oncology*. – 2022. – Vol. 33. – № 12. – P. 1250–1268.

76. Özdemir, B.H. Role of Immune Cells in the Tumor Microenvironment / B.H. Özdemir // *Cancer Research: An Interdisciplinary Approach*. – Cham : Springer Nature Switzerland, 2023. – P. 17–47.

77. PALOMA-2: Primary results from a phase III trial of palbociclib (P) with letrozole (L) compared with letrozole alone in postmenopausal women with ER+/HER2–advanced breast cancer (ABC) / R.S. Finn, M. Martin, H. Rugo [et al.]. – 2016.

78. Pathologic complete response (pCR) to neoadjuvant treatment with or without atezolizumab in triple-negative, early high-risk and locally advanced breast cancer: NeoTRIP Michelangelo randomized study / L. Gianni, C.S. Huang, D. Egle [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2022. – Vol. 33. – № 5. – P. 534–543.

79. Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy predicts improved survival in all major subtypes of breast cancer: systematic review and meta-analyses of over 18,000 patients / L. Spring, R. Greenup, K. Reynolds [et al.] // *Cancer Research*. – 2016. – Vol. 76. – № 14 Supplement. – P. 1439–1439.

80. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis / P. Cortazar, L. Zhang, M. Untch [et al.] // *The Lancet*. – 2014. – Vol. 384. – № 9938. – P. 164–172.

81. Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers / C.M. Balch, L.B. Riley, Y.J. Bae [et al.] // *Archives of Surgery*. – 1990. – Vol. 125. – № 2. – P. 200–205.

82. PD-L1 expression and the immune microenvironment in primary invasive lobular carcinomas of the breast / E.D. Thompson, J.M. Taube, R.J. Asch-Kendrick [et al.] // *Mod Pathol*. – 2017. – Vol. 30. – P. 1551–1560.

83. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer / P. Schmid, J. Cortes, L. Pusztai [et al.] // *N Engl J Med*. – 2020. – Vol. 382. – № 9. – P. 810–821.

84. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer / J. Cortes, H.S. Rugo, D.W. Cescon [et al.] // *N Engl J Med*. – 2022. – Vol. 387. – № 3. – P. 217–226.

85. Peripheral CD8<sup>+</sup> CD28-suppressive T lymphocytes act as a prognosticator among breast cancer patients with adoptive T-cell immunotherapy / Q. Song, J. Ren, J. Yu, X. Wang [et al.] // *Cancer Research*. – 2016. – Vol. 76. – № 14\_Supplement. – P. 3417–3417.

86. Peripheral human CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> T lymphocytes give rise to CD28<sup>-</sup> progeny, but IL-4 prevents loss of CD28 expression / M. Labalette, E. Leteurtre, C. Thumerelle [et al.] // *International immunology*. – 1999. – Vol. 11. – № 8. – P. 1327–1336.

87. Pitfalls in assessing stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTILs) in breast cancer / Z. Kos, E. Roblin, R.S. Kim [et al.] // *NPJ Breast Cancer*. – 2020. – Vol. 6. – P. 17.

88. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors / S.R. Mattarollo, S. Loi, H. Duret [et al.] // *Cancer Res*. – 2011. – Vol. 71. – № 14. – P. 4809–4820.

89. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy for breast cancer with BRCA mutations: a meta-analysis / C.J. Wang, Y. Xu, Y. Lin [et al.] // *Frontiers in oncology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 592998.
90. Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes to pathological complete response in neoadjuvant treated triple-negative breast cancers / M. Ruan, T. Tian, Rao J. [et al.] // *Diagn Pathol*. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. 66.
91. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 / N. Wolmark, J. Wang, E. Mamounas [et al.] // *JNCI Monographs*. – 2001. – № 30. – P. 96–102.
92. Preoperative chemotherapy: updates of national surgical adjuvant breast and bowel project protocols B-18 and B-27 / P. Rastogi, S.J. Anderson, H.D. Bear [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2008. – Vol. 26. – № 5. – P. 778–785.
93. Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer / D. Miles, J. Gligorov, F. André [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2021. – Vol. 32. – № 8. – P. 994–1004.
94. Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98 / S. Loi, N. Sirtaine, F. Piette [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 31. – № 7. – P. 860–867.
95. Prognostic significance of CD8+ T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade / K. Baker, J. Lachapelle, I. Zlobec [et al.] // *Histopathology*. – 2011. – Vol. 58. – P. 1107–1116.
96. Prognostic Value of Tumor-Associated Macrophages According to Histologic Locations and Hormone Receptor Status in Breast Cancer / J.M. Gwak, M.H. Jang, D.I. Kim [et al.] // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – № 4. – P. e0125728.

97. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse / G.J. Bates, S.B. Fox, C. Han [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – № 34. – P. 5373–5380.

98. Residual cancer burden after neoadjuvant chemotherapy and long-term survival outcomes in breast cancer: a multicentre pooled analysis of 5161 patients / C. Yau, M. Osdoit, M. van der Noordaa [et al.] // *The Lancet. Oncology.* – 2022. – Vol. 23. – № 1. – P. 149–160.

99. Simon, R. The Norton-Simon hypothesis: Designing more effective and less toxic chemotherapeutic regimens / R. Simon, L. Norton // *Nat Clin Pract Oncol.* – 2006. – Vol. 3. – P. 406–407.

100. Somatic mutation load of estrogen receptor-positive breast tumours predicts overall survival: an analysis of genome sequence data / S. Haricharan, M.N. Bainbridge, P. Scheet [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* – 2014. – Vol. 146. – P. 211–220.

101. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: Recommendations from an international working group / E. Provenzano, V. Bossuyt, G. Viale [et al.] // *Mod Pathol.* – 2015. – Vol. 28. – № 9. – P. 1185–1201.

102. Steinman, R.M. Tolerogenic Dendritic Cells / R.M. Steinman, D. Hawiger, M.C. Nussenzweig // *Annual Review of Immunology.* – 2003. – Vol. 21. – P. 685–711.

103. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion / A. Orimo, P.B. Gupta, D.C. SgROI [et al.] // *Cell.* – 2005. – Vol. 121. – № 3. – P. 335–348.

104. Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response—final results from GeparSixto / S. Loibl, K.E. Weber, K.M. Timms [et al.] // *Annals of Oncology.* – 2018. – Vol. 29. – № 12. – P. 2341–2344.

105. Survival outcomes in breast cancer patients with low estrogen/progesterone receptor expression / A. Balduzzi, V. Bagnardi, N. Rotmensz [et al.] // *Clinical breast cancer.* – 2014. – Vol. 14. – № 4. – P. 258–264.

106. T helper cell-specific regulation of inducible costimulator expression via distinct mechanisms mediated by T-bet and GATA-3 / A.H.-M. Tan, S.Y.-P. Goh, S.-C. Wong, K.-P. Lam // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 1. – P. 128–136.

107. Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation / J.K. Litton, H.S. Rugo, J. Ettl [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2018. – Vol. 379. – № 8. – P. 753–763.

108. Terabe, M. The Role of NKT cells in Tumor Immunity / M. Terabe, J.A. Berzofsky // *Adv Cancer Res*. – 2008. – Vol. 101. – P. 277–348.

109. The effect of abemaciclib plus fulvestrant on overall survival in hormone receptor-positive, ERBB2-negative breast cancer that progressed on endocrine therapy—MONARCH 2: a randomized clinical trial / G.W. Sledge, M. Toi, P. Neven [et al.] // *JAMA oncology*. – 2020. – Vol. 6. – № 1. – P. 116–124.

110. The evolving role of CD8+ CD28– immunosenescent T cells in cancer immunology / W.X. Huff, J.H. Kwon, M. Henriquez [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 11. – P. 2810.

111. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients / C. Medrek, F. Pontén, K. Jirstrom, K. Leandersson // *BMC Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 1. – P. 306.

112. Tumor growth and angiogenesis are dependent on the presence of immature dendritic cells / O. Fainaru, N. Almog, C.W. Yung [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2010. – Vol. 24. – № 5. – P. 1411–1418.

113. Tumor infiltrating lymphocytes across breast cancer subtypes: current issues for biomarker assessment / C. Valenza, B.T. Salimbeni, C. Santoro [et al.] // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15. – № 3. – P. 76.

114. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer / C. Denkert, S. Loibl, A. Noske [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 28. – № 1. – P. 105–113.

115. Tumor-Educated CD11b high Ia low Regulatory Dendritic Cells Suppress T Cell Response through Arginase I / Q. Liu, C. Zhang, A. Sun [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 182. – № 10. – P. 6207–6216.

116. Tumor-infiltrating B cells signal functional humoral immune responses in breast cancer / S. Garaud, L. Buisseret, C. Solinas [et al.] // *JCI Insight*. – 2019. – Vol. 4. – № 18. – P. e129641.

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

118. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in epithelial ovarian cancer: heterogeneity, prognostic impact, and relationship with immune checkpoints / Delphine Hudry, S. Le Guellec, S. Meignan [et al.] // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14. – № 21. – P. 5332.

119. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer / N.R. West, K. Milne, P.T. Truong [et al.] // *Breast Cancer Res*. – 2011. – Vol. 13. – P. R126.

120. Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Predictive and Prognostic Biomarker in Neoadjuvant-treated HER2-positive breast cancer / B. Ingold-Heppner, M. Untch, C. Denkert [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2016. – Vol. 22. – P. 5747–5754.

121. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer / Y. Asano, S. Kashiwagi, W. Goto [et al.] // *Br J Surg*. – 2016. – Vol. 103. – P. 845–854.

122. Tumour-infiltrating CD8<sup>+</sup> lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer / A.N. Seo, H.J. Lee, E.J. Kim [et al.] // *Br J Cancer*. – 2013. – Vol. 109. – № 10. – P. 2705–2713.

123. Tumour-infiltrating lymphocytes and molecular response after neoadjuvant therapy for HR<sup>+</sup>/HER2- breast cancer: results from two prospective trials / M.V. Dieci, A. Frassoldati, D. Generali [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2018. – Vol. 29. – P. 1233–1240.

124. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome / J. Galon, A. Costes, F. Sanchez-Cabo [et al.] // *Science*. – 2006. – Vol. 313. – № 5795. – P. 1960–1964.

125. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy / M. Binnewies, E.W. Roberts, K. Kersten [et al.] // *Nature Medicine*. – 2018. – Vol. 24. – № 5. – P. 541–550.

126. Updated overall survival of ribociclib plus endocrine therapy versus endocrine therapy alone in pre-and perimenopausal patients with HR+/HER2–advanced breast cancer in MONALEESA-7: a phase III randomized clinical trial / Y.S. Lu, S.A. Im, M. Colleoni [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2022. – Vol. 28. – № 5. – P. 851–859.

127. Using Clinical Factors and Mammographic Breast Density to Estimate Breast Cancer Risk: Development and Validation of a New Predictive Model / J.A. Tice, S.R. Cummings, R. Smith-Bindman [et al.] // *Annals of Internal Medicine*. – 2008. – Vol. 148. – № 5. – P. 337.

128. Vujanovic, L. CD56dim CD16– natural killer cell profiling in melanoma patients receiving a cancer vaccine and interferon- $\alpha$  / L. Vujanovic, C. Chuckran, Y. Lin [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 14.

129. Weekly Paclitaxel in the Adjuvant Treatment of Breast Cancer / J.A. Sparano, M. Wang, S. Martino [et al.] // *N Engl J Med*. – 2008. – Vol. 358. – № 16. – P. 1663–1671.