

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2026 г

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук
доктор биологических наук

Артамонова Елена Владимировна
Заботина Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты:

Сперанский Дмитрий Леонидович, доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии, гематологии и трансплантологии Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Титов Константин Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник научно-клинического отдела Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский многопрофильный научно-клинический центр имени С.П. Боткина» департамента здравоохранения города Москвы».

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Защита состоится «04» июня 2026 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

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

Автореферат разослан «.....» 2026 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук

Гордеев Сергей Сергеевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак молочной железы (РМЖ) сохраняет статус одной из наиболее социально значимых проблем современной онкологии, ежегодно поражая более 2,5 миллионов женщин в мире и являясь ведущей причиной смерти от злокачественных новообразований среди женского населения в Российской Федерации. Согласно статистическим данным за 2022 год, в России регистрируется свыше 75–78 тысяч новых случаев РМЖ, при этом риск смерти от данной патологии составляет около 1,5–1,7%, что диктует необходимость постоянного совершенствования терапевтических стратегий. Современный подход к лечению основывается на широком применении неоадьювантной химиотерапии, которая позволяет не только добиться контроля над местнораспространенным процессом, но и оценить индивидуальную чувствительность опухоли к химиотерапии (ХТ). Достижение полного патоморфологического ответа (pCR, RCB 0) признано ключевым суррогатным биомаркером, напрямую коррелирующим с показателями безрецидивной и общей выживаемости, что особенно критично для тройного негативного рака молочной железы (ТН РМЖ). В то же время, при люминальном В HER2-негативном РМЖ вопросы целесообразности проведения неоадьювантной химиотерапии (НАХТ) и поиска предиктивных маркеров остаются предметом активных научных дискуссий из-за более низкой частоты достижения полных регрессий.

Особый научный интерес в последние десятилетия вызывает роль иммунной системы и инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ), которые играют определяющую роль в формировании противоопухолевого иммунитета. Фундаментальные работы, начиная с исследований Е.В. Артамоновой (2003 г.) и заканчивая крупными мета-анализами С. Denkert, доказали прогностическую значимость высокого уровня инфильтрации лимфоцитами. Однако подавляющее

большинство существующих исследований ограничивается оценкой лишь общего содержания ИОЛ, не раскрывая прогностического значения отдельных субпопуляций. В этой связи применение проточной цитометрии для детального анализа субпопуляционного состава иммунного микроокружения в материале кор-биопсии открывает новые возможности в поиске прецизионных предикторов ответа на НАХТ, что является необходимым условием для дальнейшей персонализации лечения больных HER2-негативным раком молочной железы.

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 местно-распространенным 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 опухоли инфильтрирующих лимфоцитов до проведенной неоадьювантной 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.

Методология и методы исследования

В поисковой работе использован проспективный клинический материал кор-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 по 2023 год в исследование включены 179 пациентов ранее не получавшие лечение по поводу РМЖ. В зависимости от иммунофенотипа опухоли пациенты разделены на 2 группы: тройной негативный (90 пациенток) и люминальный В HER2-негативный (89 пациенток). Исследование субпопуляционной структуры иммунного микроокружения опухоли проведено на базе лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России на 5-параметровом проточном цитометре аналитического типа FACSCalibur производства компании Becton Dickinson (США) с помощью которого определяли процентное содержание популяций лимфоцитов.

Научная новизна

В рамках данной диссертационной работы впервые подробно исследован субпопуляционный состав инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, а также их предиктивная роль для пациентов с HER2-негативным раком молочной железы, получающих неоадьювантную химиотерапию. При ТН РМЖ выявлены значимые предикторные субпопуляции для достижения полного патоморфологического ответа, такие как CD8+CD279+(PD1+) и CD8+CD28-. Для люминального В HER2-негативного рака также выявлены предикторные популяции – CD3-CD16+CD56+, CD4+CD25+, CD8+CD279+(PD1+). 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 неoadьювантном этапе лечения.

Личный вклад

Личный вклад автора заключается в организации и проведении сбора клинических данных, а также в лечении пациентов с РМЖ и анализе результатов полученных данных. Все этапы исследования, включая контроль за процессом и обработку данных с использованием статистических программ, были выполнены автором. Кроме того, автор подготовил научные публикации, в том числе в соавторстве, отражающие полученные результаты. Весь научный материал был подготовлен и систематизирован для включения в диссертацию.

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».

Положения, выносимые на защиту

1. Субпопуляции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ИОЛ) играют значимую роль в прогнозировании ответа на неoadьювантную химиотерапию при раке молочной железы. Наибольшее влияние на вероятность достижения полного патоморфологического ответа оказывают CD8⁺ - цитотоксические лимфоциты,

особенно субпопуляции CD8+CD28- и CD8+CD279+ 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+) лимфоцитов имеют влияние в зависимости от подтипа рака. Высокое содержание регуляторных лимфоцитов CD4+CD25+ 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+CD16+CD56+ (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+Perforin+ лимфоцитов, что может отражать особенности иммунного ответа этого подтипа. При анализе местнораспространенных стадий заболевания выявлено повышенное содержание CD8+CD28+ лимфоцитов при люминальном HER2-негативном РМЖ и CD4+CD152+ лимфоцитов при ТН РМЖ. Эти различия подчеркивают значимость субпопуляционного анализа лимфоцитов для понимания механизмов противоопухолевого иммунитета и разработки персонализированных подходов к лечению.

Внедрение результатов исследования

Установленные в данном исследовании иммунологические маркеры эффективности неoadъювантной химиотерапии при раке молочной железы на основе

иммунофенотипа первичной опухоли и субпопуляционного состава лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, широко внедрены и используются в повседневной диагностической практике отделения противоопухолевой лекарственной терапии №1 отдела лекарственного лечения НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для персонализации лечебных и диагностических подходов (акт о внедрении результатов кандидатской диссертационной работы от 12 декабря 2024 года).

Апробация

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

Основные результаты исследования представлены в 4 научных статьях в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Объём и структура работы

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

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В проспективное одноцентровое исследование, проводимое в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в 2018–2023 гг., были включены 179 пациенток с первично-операбельным и местнораспространенным первично-неоперабельным тройным негативным (с включением ER-low) и люминальным В HER2-негативным раком молочной железы. Пациентки были распределены на группы в соответствии с фенотипом опухоли. Все пациентки получали НАХТ с последовательным применением антрациклинов и таксанов: при ТНPMЖ — 4 цикла ACdd (доксорубин 60 мг/м² + циклофосфамид 600 мг/м² 1 раз в 14 дней) с последующими 12 циклами паклитаксел 80 мг/м² + карбоплатин AUC2 еженедельно; при люминальном В HER2-негативном — 4 цикла ACdd и далее 4 цикла доцетаксел 75 мг/м² 1 раз в 21 день. Профилактика нейтропении осуществлялась с использованием Г-КСФ. По завершении терапии выполнялось контрольное обследование и хирургическое вмешательство. Эффективность лечения в процессе НАХТ оценивалась клинически и инструментально (осмотр, ММГ+УЗИ), а на послеоперационном этапе по результатам гистологического исследования, с расчётом индекса RCB (Residual Cancer Burden) при наличии резидуальной опухоли.

Критерии включения и исключения

В исследование включались все пациентки с впервые выявленным PMЖ с первичной опухолью >2см (T2-4N0-3), при наличии морфологического и иммуногистохимического подтверждения диагноза. Исключались пациентки с ранее полученным лечением по поводу PMЖ в течение 5 лет, тяжёлыми сопутствующими заболеваниями, беременностью и лактацией, наличием отдаленных метастазов.

Объем обследования

До начала НАХТ проводилось комплексное обследование, включая маммографию, УЗИ, МРТ молочных желез, КТ, сцинтиграфию костей, ЭКГ, ЭхоКГ, а также кор-биопсию опухоли с иммуногистохимическим исследованием (РЭ, РП,

HER2, ki67), цитологическое подтверждение поражения лимфоузлов, ПЦР-тест на определение мутаций в генах BRCA1/2 и при необходимости выполнялся NGS.

Статистическая обработка

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ IBM SPSS v26 и MS Excel с использованием непараметрических критериев (Манна–Уитни, Уилкоксона, Краскала–Уоллиса), ROC-анализа и логистической регрессии. Значимые различия принимались при $p < 0,05$.

Иммунологическое исследование

Материалом для исследования служили образцы опухолевой ткани, полученные методом core-биопсии под УЗИ-контролем до начала лечения. Образцы подвергались механической фрагментации в растворе натрия хлорида для получения клеточной суспензии. Идентификация субпопуляций лимфоцитов проводилась на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Использовались моноклональные антитела к CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD28, CD25, CD127, HLA-DR, CD19, CD45, CD279(PD-1) и внутриклеточному белку Perforin. Процентное содержание каждой субпопуляции определялось в гейте CD45+ лимфоцитов (Рисунок 1).

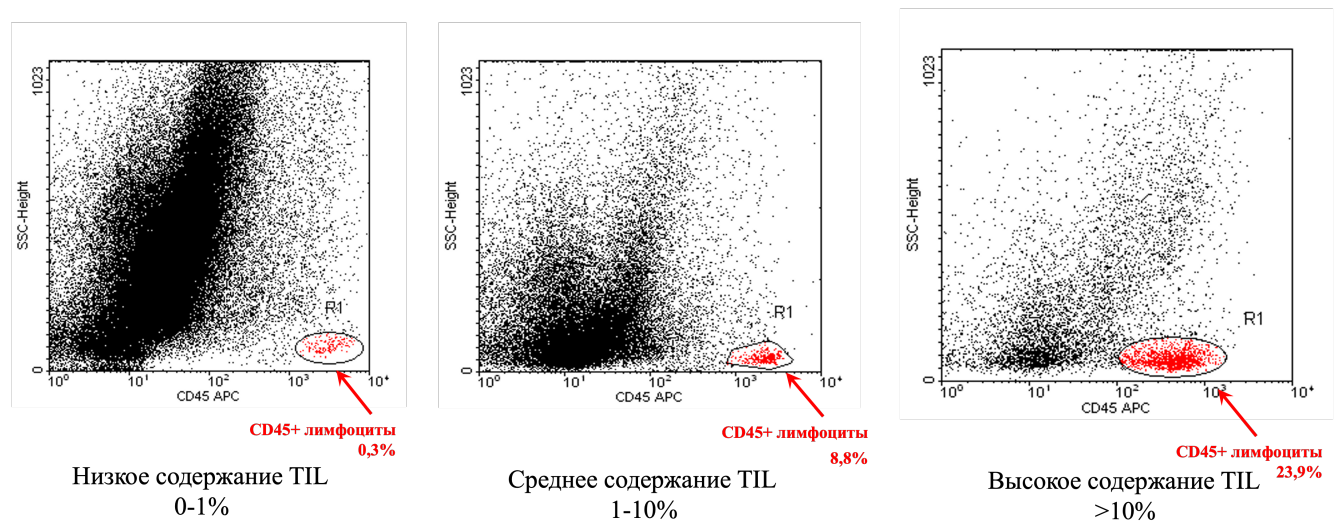


Рисунок 1 - Анализ популяций CD45+ лимфоцитов (ИОЛ) с различной степенью инфильтрации в опухолевой ткани

Результаты исследования

Тройной негативный рак молочной железы

В исследование включено 90 пациенток с ТН РМЖ. Медиана возраста составила 49 лет (29-71). У 32 пациенток (35,5%) была II стадия заболевания, III в 58 случаях (64,4%). Большинство – 59 (66%) имели поражение регионарных лимфатических узлов (N+). В 55 (61%) наблюдениях отмечен местнораспространенный первично-неоперабельный процесс (T3-4 и/или N2/N3), в 35 (39%) – первично-операбельный. Частота герминальных мутаций в генах BRCA1/2 составила 16,7% (N=15). В 99% случаев опухоль была представлена инвазивным раком неспецифического типа. В 51% степень злокачественности G2, в 49% - G3. Хирургический этап лечения был выполнен у всех 90 пациенток. 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%) (Таблица 1).

Таблица 1 – Патоморфологический ответ после завершения химиотерапии у пациентов с ТН РМЖ

Патоморфологический ответ на лечение	N	%
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		

Анализ субпопуляционного состава ИОЛ до лечения был проведен с оценкой 31 субпопуляции, включая минорные, и двух интегральных показателей, 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 кор-биопсии материала в некоторых образцах.

Медиана (Me) содержания всех ИОЛ (CD45+) в группах с полным (1,1%) и не полным (0,8%) патоморфозом статистически значимо не различалась (p=0,271). При анализе субпопуляционного состава популяций CD8+CD279+(PD1+) и CD8+CD28- было выявлено достоверное различие в группах RCB 0 vs RCB I-III (Таблица 2).

Таблица 2 - 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
CD4+CD25 ^{high} CD127 ^{-low}	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+ (PD1+)	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	0,040
CD3-CD8+(PD1+)	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	0,003
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
CD8+CD11b+CD28-	24,6 (12,8-29,7)	17	19,7 (14,6-28,2)	17	0,786
CD8+CD11b+CD28+	12,5 (9,6-20,4)	17	11,7 (8,1-16,4)	17	0,496
CD8+CD11b-CD28-	39,3 (33,3-57,3)	17	49,4 (39,8-58,0)	17	0,394
CD8+CD11b-CD28+	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

Так, субпопуляция CD8+CD279+(PD1+) была определена в 39 образцах опухолей ТН РМЖ, частота ее составила 43% (39/90), медиана 14,2%. При полном патоморфологическом ответе медиана CD8+CD279+(PD1+) составила 18,6% против 12,3% при неполном ($p=0,033$). При уровне CD8+CD279+(PD1+) выше медианы частота RCB 0 составила 57,9%, тогда как в подгруппе с содержанием CD8+CD279+(PD1+) менее или равно медиане частота pCR составила 35% ($p=0,152$).

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 ($p=0,005$). 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.

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 медиане.

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. При проведении множественного логистического анализа (многофакторный анализ) было выявлено, что стадия T3-4 и CD3+CD16+CD56+ лимфоциты \leq Me достоверно увеличивают риск недостижения полного патоморфологического ответа. Таким образом, выделяя подгруппу больных со стадией T1-2 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 была предпринята попытка определить пороговое значение CD3+CD16+CD56+ лимфоцитов для достижения pCR. Площадь под кривой составила 0,633, предсказательная способность модели — 0,49, что указывает на её низкую информативность. Пороговое значение 9,3 (чувствительность 0,630, специфичность 0,357) совпадает с медианой данной субпопуляции (Рисунок 2).

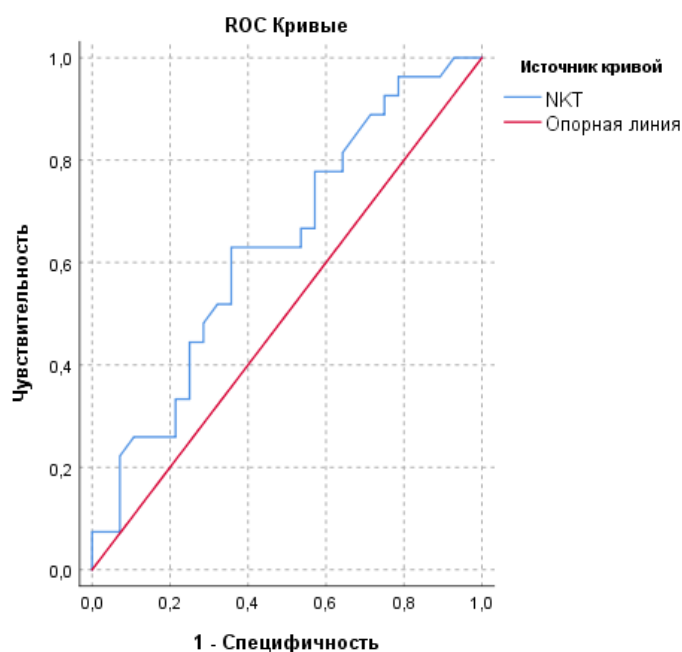


Рисунок 2 - ROC-кривая при определении порогового уровня чувствительность/специфичность для CD3+CD16+CD56+ лимфоцитов

Люминальный В HER2-негативный РМЖ

В исследование включено 89 пациенток с ранним и местно-распространенным люминальным В HER2-негативным РМЖ, получавших неoadъювантную химиотерапию. Средний возраст составил 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%). 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 В опухолях составил 55,6 +/- 20,3% (мин. 20, макс. 90, медиана 55). 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 3). Для люминального В HER2-негативного РМЖ фактором благоприятного прогноза являлось достижение RCB 0-1, частота которых составила 25,8% (23/89).

Таблица 3 - Патоморфологический ответ после завершения химиотерапии при люминальном В HER2-негативном 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		

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).

При анализе субпопуляционного состава было выявлено статистически значимое различие в группах RCB 0-1 vs RCB 2-3 для популяций CD4+CD25+ и

CD8+CD279+(PD1+). Для субпопуляции CD3-CD16+CD56+ была отмечена численная тенденция влияния на достижение RCB 0-1, однако не достигла статистической значимости ($p=0,055$) (Таблица 4). Принимая во внимание то, что работа носит поисковый характер, а также небольшой набор данных, данная субпопуляция была изучена при дальнейшем анализе.

Таблица 4 - Особенности субпопуляционного состава ИОЛ в первичной опухоли люминального В HER2-негативного 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 ^{high} CD127 ^{-/low}	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	0,055
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	0,013
CD4+CD279+(PD1+)	12,4 (10,3-18,5)	12	14,6 (8,2-20,5)	34	0,990
CD8+CD279+(PD1+)	9,5 (5,5-11,2)	15	16,3 (6,5-23,3)	36	0,041
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

Продолжение таблицы 4

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
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
CD8+CD11b+CD28-	21,2 (12,8-30,3)	9	16,2 (12,7-23,3)	28	0,680
CD8+CD11b+CD28+	9,5 (7,7-13,3)	9	11,0 (6,8-14,3)	28	0,784
CD8+CD11b-CD28-	47,0 (30,1-49,3)	9	44,1 (37,7-55,8)	28	1,000
CD8+CD11b-CD28+	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

Таким образом, в группе RCB 0-1 медиана CD3-CD16+CD56+ составила 2,7 против 4,2 в группе RCB 2-3 ($p=0,055$). При анализе частоты патоморфоза в зависимости от медианы содержания данной популяции выявлено, что повышенное содержание CD3-CD16+CD56+ является неблагоприятным фактором достижения RCB 0-1 (37,9% против 20,7%, $p=0,149$). 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%, $p=0,001$). Содержание CD8+CD279+(PD1+) 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+(PD1+) является благоприятным и достоверным фактором достижения RCB 0-1 (46,2% против 12,0%, $p=0,007$).

При проведении регрессионного однофакторного анализа было выявлено, что предикторами достижения лучшего патоморфологического ответа являлись: отсутствие поражения регионарных лимфоузлов (N0), G3, возраст ≤ 50 лет, рецепторы прогестерона менее 20%, CD8+CD279+(PD1+) \leq Me, CD4+CD25+ $>$ Me. Далее был проведен многофакторный регрессионный анализ, включающий показатели, выявленные в однофакторном анализе, где было показано, что ни один фактор не явился самостоятельным предиктором достижения RCB 0-1 у больных люминальным В HER2-негативным раком молочной железы.

Сравнение субпопуляционного состава между подтипами 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, $p=0,646$). 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, $p=0,029$). Также было выявлено значимое увеличение CD4+CD152+ лимфоцитов при ТН РМЖ (3,9% против 1,1% при люминальном В HER2-негативном РМЖ, $p=0,033$). Определено достоверно значимое различие в содержании CD4+CD25+ активированных лимфоцитов, 8,0% при ER-low и 10,4% при ТН РМЖ ($p=0,035$). Дополнительно стоит отметить количественные, но не статистически значимые различия в содержании таких субпопуляций как CD3-CD16+CD56+ (NK-клеток) (11,9% и 4,4% соответственно), CD3+CD16+CD56+ (NKT) (11,1% и 9,3% соответственно) и В-лимфоцитов (4,6% и 2,0% соответственно) (Рисунок 3).

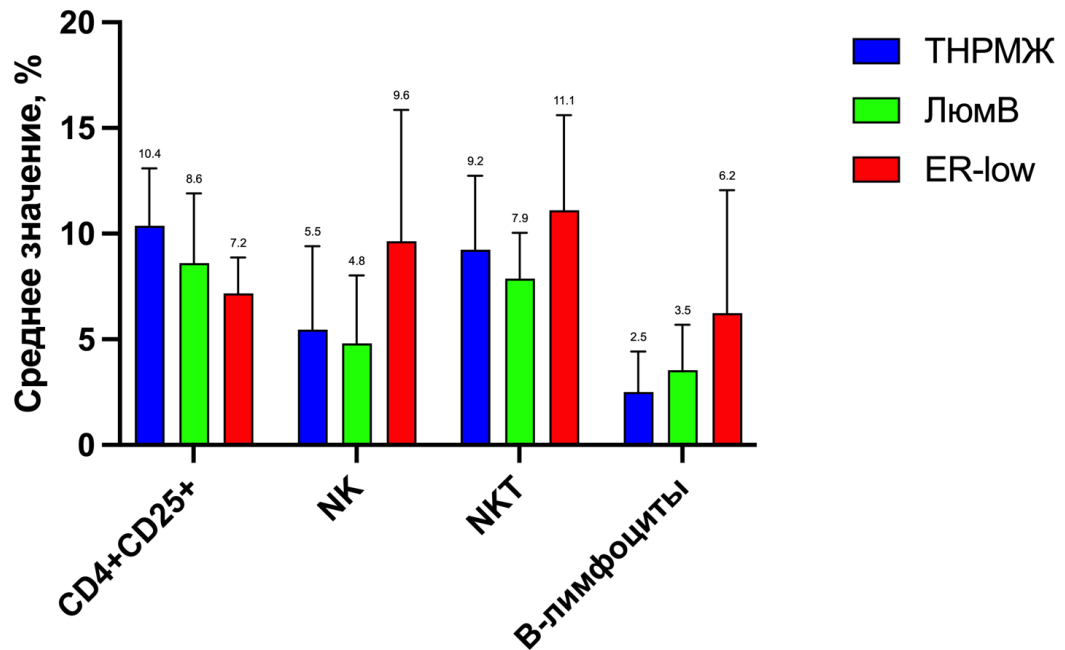


Рисунок 3 - Сравнение субпопуляций при разных подтипах РМЖ

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 неoadьювантную химиотерапию рекомендуется дополнить стандартное исследование уровня опухолев-инфильтрирующих лимфоцитов методом проточной цитометрии с оценкой конкретных субпопуляций:

1.1. для трижды негативного РМЖ (ТН РМЖ): CD8+CD28-, CD8+CD279+(PD1+) и CD3+CD16+CD56+;

1.2. для люминального В HER2-негативного РМЖ: CD4+CD25+ и CD8+CD279+(PD1+);

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

2.1. CD8+CD279+(PD1+) и CD3+CD16+CD56+ выше и ниже медианных значений.

3. Рекомендуется учитывать биологический подтип опухоли при интерпретации уровня экспрессии CD8+CD279+(PD1+) клеток, так как их прогностическое значение диаметрально противоположно при ТН и ЭР+ РМЖ:

3.1. у пациенток с люминальным В HER2–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 благоприятным ответом.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективы дальнейшей разработки темы включают расширение исследования субпопуляционного состава ИОЛ на более крупной выборке с валидацией ключевых маркеров, таких как CD8+CD28– и CD8+CD279+(PD1+), с целью определения их предиктивной функции ответа на химиотерапию. Актуально изучение динамики ИОЛ в процессе лечения и в рецидивных очагах, а также интеграция данных с клиническими и молекулярными характеристиками опухоли. Дополнительный интерес представляет анализ ИОЛ при терапии новыми агентами, включая таргетные и иммуноонкологические препараты, что позволит сформировать персонализированные подходы к лечению рака молочной железы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Субпопуляционный состав опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов при люминальном раке молочной железы и его влияние на эффективность неоадьювантной химиотерапии / Е. И. Коваленко, Е. В. Артамонова, Т. Н. Заботина, З. Г. Кадагидзе, С. Г. Багрова, М. В. Киселевский, И. К. Воротников, Д. А. Денчик, В. И. Кузьмина, Е. Н. Захарова, Э. К. Шоуа, В. А. Хайленко, Я. А. Жуликов, **М. В. Хорошилов**, А. В. Егорова // Медицинский алфавит. – 2020. – № 29. – С. 32–37.

2. Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы с результатами лечения / Т.Н. Заботина, А.И. Черткова, А.А. Борунова, Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа, Е.В. Артамонова, Е.И. Коваленко, **М.В. Хорошилов**, З.Г. Кадагидзе. // Российский биотерапевтический журнал. – 2021. – Т. 20, № 3. – С. 25-33.

3. Субпопуляционный состав опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов при раннем и местнораспространенном тройной негативном раке молочной железы и его влияние на эффективность неoadьювантной химиотерапии / **М.В. Хорошилов**, Е.И. Коваленко, Е.В. Артамонова, Т.Н. Заботина, И.С. Стилиди, Я.А. Жуликов, Е.В. Евдокимова, А.В. Петровский, Д.А. Денчик, И.К. Воротников, В.Н. Шолохов, С.Н. Бердников, Э.К. Шоуа, З.Г. Кадагидзе. // Злокачественные опухоли. – 2023. – Т. 13. – № 4. – С. 28-36.

4. Мембранные (CD8⁺PD-1⁺ и CD4⁺PD-1⁺) и растворимые (sPD-1 и sPD-L1) формы контрольных точек иммунитета у больных меланомой, раком молочной железы и раком слизистой оболочки полости рта / Т.Н. Заботина, А.И. Черткова, А.А. Борунова, Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн, Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа, В.Т. Циклаури, И.В. Самойленко, М.В. Хорошилов, З.Г. Кадагидзе // Современная онкология. – 2023. – Т. 25. – № 3. – С. 301-307.