

Проточные цитометры BD Biosciences

идеальное решение для любых
научных и клинических задач

BD FACSCanto™



реклама

**БОЛЬШЕ ЦВЕТОВ —
БОЛЬШЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ**

- **Определение 10 параметров флуоресценции, 2 параметров светорассеяния**
- **Источники света – твердотельные лазеры (405 нм, 488 нм, 640 нм)**
- Скорость сбора данных – 33 000 событий в секунду
- Полностью автоматизированные процедуры включения/выключения, настройки прибора перед анализом
- Специализированное программное обеспечение для автоматизации сбора и анализа данных при проведении клинических исследований
- Анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови с подсчетом относительных и абсолютных значений
- Определение стволовых клеток в соответствии с международным протоколом ISHAGE
- Типирование лейкозов и определение минимальной остаточной болезни
- Контроль качества заготавливаемых препаратов крови
- Изучение функциональной активности клеток
- Научные исследования

Авторизованный дистрибьютор компании BD Biosciences в России, на Украине и Беларуси – компания «БиоЛайн»

ООО «БиоЛайн»
197101, Россия, Санкт-Петербург
Пинский пер., д.3, лит.А
тел.: (812) 320 49 49
факс: (812) 320 49 40
e-mail: main@bioline.ru
www.bioline.ru

Москва, тел.: (800) 555 49 40
Новосибирск, тел.: (383) 227 09 63
Екатеринбург, тел.: (343) 287 32 49
Нижний Новгород, тел.: (831) 278 61 47
Ростов-на-Дону, тел.: (863) 268 99 32
Казань, тел.: (843) 570 66 88
Самара, тел.: (927) 768 06 43
Сочи, тел.: (922) 115 09 20

ДП «БиоЛайн Украина»
Украина, Киев
тел.: +38 (044) 200 89 37

ООО «БиоЛайн-БС»
Республика Беларусь, Минск
тел.: +37 (517) 399 43 79

Единый
бесплатный номер
сервисной службы
для всех регионов
России:
8 800 333 00 49

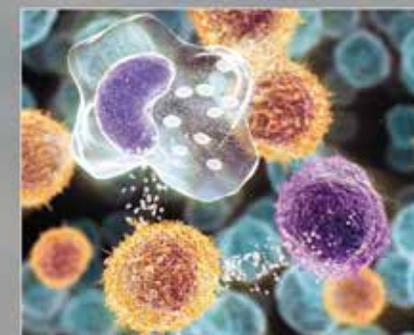


Группа компаний **БиоЛайн**

ИММУНОЛОГИЯ
ГЕМОПОЭЗА

HEMATOPOIESIS
IMMUNOLOGY

И
2/2016



ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616.-006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году
2/2016 том 14

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

ГЛАВНЫЕ РЕДАКТОРЫ: Н.Н. ТУПИЦЫН, G. JANOSSY
Ответственный секретарь А.В. Моженкова

Редакционная коллегия:

З.Г. Калагидзе (зам. главного редактора)
Е.Г. Турнянская (Москва)
Е.В. Артамонова (Москва)
Ж. Брошь (Франция)
Дж. Вижденес (Франция)
Л.Ю. Гривцова (Москва)
Дж. Джаносси (Великобритания)
И.С. Долгополов (Москва)
Т.Н. Заботина (Москва)
А.М. Ковригина (Москва)
А.М. Копылов (Москва)
Л.В. Мазурок (Курган)
А.А. Михайлова (Москва)
Д.Ш.Османов (Москва)
А.И. Павловская (Москва)
С.В. Петров (Казань)
Б.В. Пинегин (Москва)
А.В. Попа (Москва)
Н.А. Пробатова (Москва)
Р.М. Рамазанова (Казakhstan)
И.Н. Серебрякова (Москва)
Г.С. Тумян (Москва)
С.А. Тюляндин (Москва)
А.В. Филатов (Москва)
М.А. Френкель (Москва)
С.А. Шинкарев (Липецк)
Е.Н. Шолохова (Москва)
А.А. Ярилин (Москва)

Адрес редакции: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
Тел./факс: +7(499)324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

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

Свидетельство ПИ № ФС 77-23551 от 06.03.2006
Свидетельство Эл № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Подписано в печать 31.12.2015. Формат 60×90/8.

Бумага офсетная. Гарнитура «Times New Roman».

Печать офсетная.

Уч.-изд. листов 2,5. Тираж 1000 экз.

Подписной индекс № 36915

Отпечатано в типографии «ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА»

Тираж 1000 экз.

При перепечатке материалов ссылка на
«Иммунологию гемопоэза» обязательна

Издательская группа РОНЦ

Координатор: Е.Г. Турнянская. Макет: Б.Б. Крюков

НÆМАТОПОÏЕСИС IMMUNOLOGY

UDK 616.-006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006
2/2016 vol. 14

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center
affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian
Federation (HÆmatopoiesis Immunology Laboratory)
EDITORS-IN-CHIEF N.N.TUPITSYN, G. JANOSSY
Executive secretary A.V. Mozhenkova

Editorial Board:

Z.G. Kadagidze (Deputy Editor-in-Chief)
E.G. Turnianskaia (Moscow)
E.V. Artamonova (Moscow)
J. Brochier (France)
G. Wijdenes (France)
L.U. Grivtsova (Moscow)
G. Janossy (UK)
I.S. Dolgoplov (Moscow)
T.N. Zabolina (Moscow)
A. M. Kovrigina (Moscow)
A.M. Kopilov (Moscow)
L.V. Mazurok (Kurgan)
A.A. Mikhailova (Moscow)
D.Ch. Osmanov (Moscow)
A.I. Pavlovskaja (Moscow)
S. V. Petrov (Kazan)
B.V. Pinegin (Moscow)
A.V. Popa (Moscow)
N.A. Probatova (Moscow)
R.M. Ramazanova (Kazakhstan)
I.N. Serebriakova (Moscow)
G.S. Tumian (Moscow)
S.A. Tuliandin (Moscow)
A.V. Filatov (Moscow)
M.A. Frenkel (Moscow)
S.A. Shinkarev (Lipetzki)
E.N. Sholokhova (Moscow)
A.A. Iarilin (Moscow)

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian
Federation, 115478. Tel/fax: +7(499)324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru
www.ronc.ru/imhaemo_hi

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

License № ФС 77-23551 от 06.03.2006
License № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Zip-code № 36915

Published «PRACTICAL MEDICINE»

Print run 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal
Hæmatopoiesis immunolog

Coordinator: E.G. Turnyanskaya. Design: B.B. Krukov

СОДЕРЖАНИЕ**ОТ РЕДАКТОРА.....3**

*Якимович О.Ю., Вотякова О.М., Тимошенко В.В., Османов Е.А.,
Любимова Н.В., Тупицын Н.Н.*

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБЕРРАНТНОСТИ
КЛЕТОК МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ
ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ5**

Буров Д.А., Безнос О.А., Воротников И.К., Сельчук В.Ю., Тупицын Н.Н.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ
ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ
НА КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....33**

ОТ РЕДАКТОРА

В настоящем номере журнала вниманию читателей мы предлагаем две статьи по материалам соответствующих авторефератов кандидатских диссертаций.

Первая статья посвящена множественной миеломе.

Оценка минимальной остаточной болезни при этом заболевании стала компонентом рутинной практики. Совершенствуются наборы маркеров, точность проточно-цитометрической диагностики, но сам факт того, что выявление остающихся после терапии минимальных количеств опухолевых клеток позволяет установить группу неблагоприятного прогноза, убедительно доказан и не подлежит сомнению. Вместе с тем оказалось, что в существующих протоколах и публикациях есть существенный пробел. Ранее не оценивалось клиническое значение aberrантности миеломных клеток при диагностике. Это пробел восполнен в статье О.А. Якимович и соавторов. Aberrантность по наиболее часто используемым маркерам – CD45, CD19, CD56 – имеет четкую связь с клиническим течением множественной миеломы. Для различных маркеров эта связь различна, но в целом покрывает почти весь спектр симптомов заболевания. Aberrантность отражается на наличии почечной недостаточности, связана с уровнями секреции парапротеина, плазматических клеток в костном мозге и периферической крови, показателями биологической активности (СРБ) и, что самое главное – установлена достоверная связь с непосредственными результатами лечения и прогнозом. Всё это – важные вехи к пониманию патогенеза и совершенствования терапии множественной миеломы.

Вторая статья демонстрирует анализ данных по оценке взаимосвязи клинических, патоморфологических и иммунологических проявлений рака молочной железы в зависимости от экспрессии молекул HLA-I и II классов на опухолевых клетках.

Впервые Д.А. Бурова и соавторы провели анализ проточно-цитометрическим методом, то есть, даны четкие количественные критерии оценки HLA на раковых клетках. Существует высокодостоверная связь экспрессии молекул HLA на раковых клетках с уровнями инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами и их активированными формами. Уровни экспрессии молекул HLA на клетках рака молочной железы различаются в зависимости от степени злокачественности опухоли, ее пролиферативного индекса и рецепторного статуса. Впервые показаны количественные взаимоотношения уровней инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами с молекулярно-биологическими подтипами рака молочной железы. Представляется интересным и перспективным подходом регуляция экспрессии молекул гистосовместимости на клетках рака

молочной железы как инструмент влияния на активность интралимфоцитарных лимфоцитов, в том числе, имеющих непосредственное отношение к противоопухолевому иммунитету при данном заболевании.

Надеемся, приведенные современные данные послужат развитию новейших клинических подходов к пониманию патогенеза и клиники этих заболеваний, к выбору современных критериев прогноза и подбору адекватной терапии.

Главный редактор журнала
Заслуженный деятель науки РФ
профессор *Н.Н. Тулицын*

*О.Ю. Якимович, О.М. Вотякова, В.В. Тимошенко, Е.А. Османов,
Н.В. Любимова, Н.Н. Тупицын.*

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБЕРРАНТНОСТИ КЛЕТОК МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

*ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, 115478 Российская Федерация, Москва, Каширское ш., д. 24*

Резюме

Работа посвящена изучению клинического значения иммунофенотипирования плазматических клеток костного мозга в диагностике и прогнозе множественной миеломы.

Определение иммунологического фенотипа злокачественных плазматических клеток при множественной миеломе дает возможность расширить и усовершенствовать диагностические подходы для больных множественной миеломой, особенно – в сложных диагностических ситуациях, когда необходимо провести дифференциальный диагноз между множественной миеломой, плазмоцитомой с минимальным вовлечением костного мозга, моноклональными гаммапатиями неясного значения, реактивными состояниями.

На этапе первичной диагностики изучены частота и степень утраты нормального иммунофенотипа плазматических клеток по маркерам CD45, CD56 и CD19. Эти данные были сопоставлены со стандартными цитологическими и иммунологическими методами диагностики множественной миеломы (электрофорезом и иммунофиксацией белков сыворотки крови и мочи, морфологическим исследованием клеток костного мозга), а также с показателями клональности свободных легких цепей иммуноглобулинов в сыворотке крови. Проведен детальный анализ взаимосвязи aberrантного иммунофенотипа плазматических клеток по маркерам CD45, CD56 и CD19 с клинической картиной заболевания, с клинико-лабораторными и прогностически значимыми биохимическими показателями.

На большом клиническом материале изучено прогностическое значение aberrантного иммунофенотипа миеломных клеток. В работе показано, что характеристики иммунологического фенотипа плазматических клеток достоверно коррелируют с ответом на лечение, показателями общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования. Таким образом, изучение aberrантного иммунофенотипа плазматических миеломных клеток позволяет определить прогноз заболевания и соответственно провести коррекцию терапии.

Так, пациентам с прогностически наиболее неблагоприятным иммунофенотипом миеломных клеток, даже при наличии минимальных проявлений заболевания, по-видимому, следует как можно быстрее начать противоопухолевую терапию в адекватном режиме дозирования препаратов и соблюдении интервалов между курсами химиотерапии. На наш взгляд, видится неуместным придерживаться “мягкой”, выжидательной тактики лечения этой группы больных.

Кроме того, определение иммунофенотипа плазматических клеток методом проточной цитометрии на этапе установления диагноза в последующем может быть использовано для определения минимальной остаточной болезни, т.е. определения полноты ремиссии.

Ключевые слова: множественная миелома, аберрантный иммунофенотип плазматических клеток, маркеры CD45, CD19 и CD56, клиничко-лабораторные показатели, прогноз, показатели выживаемости. follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol 2014, 15: 69–77.

Список сокращений

АутоТСК – аутологичная трансплантация стволовых клеток-предшественников гемопоэза

ВХТ – высокодозная химиотерапия

Выживаемость

БВП – выживаемость без прогрессирования заболевания (PFS – progression free survival)

ОВ – общая выживаемость (OS – overall survival)

ИЛ-6 – интерлейкин-6

ИФТ – иммунофенотип

МКА – моноклональные антитела

МОБ – минимальная остаточная болезнь (MRD – minimal residual disease)

ММ – множественная миелома (Multiple myeloma)

ОХЧР – очень хорошая частичная ремиссия

ПР – полная ремиссия

ЧР – частичная ремиссия

СЛЦ – свободные легкие цепи (Ig)

СРБ – с-реактивный белок

ISS – International Staging System (международная система стадирования ММ)

NCCN – National Comprehensive Cancer Network (Национальная всеобщая онкологическая сеть)

*O.Yu. Yakimovich, O.M. Votyakova, V.V. Timoshenko, E.A. Osmanov,
N.V. Lyubimova, N.N. Tupitsyn*

CLINICAL SIGNIFICANCE OF MULTIPLE MYELOMA CELL ABBERRANCY ASSESSMENT AT DISEASE DIAGNOSIS

*N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow,
Russian Federation, 115478*

Summary

Our work is devoted to studying of clinical value of immunophenotyping of plasma cells of bone marrow in diagnostics and the forecast of the multiple myeloma.

Definition of the immunologic phenotype of malignant plasma cells at the multiple myeloma gives the chance to dilate and improve diagnostic approaches for patients with multiple myeloma, especially, in difficult diagnostic situations when it is necessary to carry out the differential diagnosis between multiple myeloma, plasmacytoma with the minimum involvement of bone marrow, monoclonal gammopathy of undetermined significance and reactive states.

In our work at a stage of primary diagnostics there were studied the frequency and extent of loss of a normal immunophenotype of multiple myeloma plasma cell markers CD45, CD56 and CD19. These data were compared to standard cytologic and immunologic diagnostic methods of the multiple myeloma (an electrophoresis and immunofixation of serum proteins and urine, a morphological research of bone marrow cells), and also with indicators of clonality of free light chains of immunoglobulins in blood serum. The detailed analysis of interrelation of the aberrant immunophenotype of plasma cell markers CD45, CD56 and CD19 with a clinical picture of the disease, with clinical, laboratory and prognostically significant biochemical indicators was carried out.

On clinical material prognostic value of the aberrant immunophenotype of plasma cells was studied. In our work it was shown that characteristics of the immunologic phenotype of plasma cells authentically correlate with the response to treatment, indicators of the overall survival and progression free survival. Thus, studying the aberrant immunophenotype of plasma myeloma cells allows to define the forecast of the disease and to respectively carry out therapy correction. So, in patients with prognostically most adverse immunophenotype of plasma cells, even in the presence of the minimum implications of the disease, apparently, it is necessary to begin as soon as possible antitumoral therapy in an adequate regimen of dosage of drugs and keeping of intervals between chemotherapy courses. In our

opinion, seems inappropriate to adhere to soft, expectant tactics of treatment of this group of patients.

Besides, definition of the immunophenotype of plasma cells by method of flow cytometry at a stage of establishment of the diagnosis in the subsequent can be used for definition of the minimum residual disease, i.e. definition of completeness of remission.

Key words: multiple myeloma, aberrant immunophenotype of malignant plasma cells, CD45, CD19, and CD56 markers, clinical and laboratory parameters, forecast, survival indicators.

Введение

Множественная (плазмноклеточная по классификации ВОЗ) миелома – опухоль, состоящая из терминально дифференцированных В-лимфоцитов, которые имеют структуру плазматических клеток или их ближайших предшественников (проплазмоцитов и плазмобластов), с многоочаговым (или диффузным) поражением костного мозга. Опухолевые плазмоциты в 100 % случаев содержат белковый продукт (однотипные молекулы иммуноглобулинов – полноценные или неполноценные) и в 98 % случаев секретируют его, формируя М-компонент [1].

По данным европейской гематологической ассоциации множественная миелома составляет 10–15 % гемобластозов [2]. По данным РОНЦ им. Н.Н. Блохина в России в 2013 году диагностировано 3041 случаев множественной миеломы; заболеваемость составила 0,54 среди мужчин и 0,59 среди женщин на 100 000 населения. По сравнению с 2008 годом прирост абсолютного числа заболевших множественной миеломой составил 22,2 %. Число умерших в 2013 году от множественной миеломы составило 2205 человек – 0,63 среди мужчин и 0,92 среди женщин на 100 000 населения [3].

На сегодняшний день существует 3 стандартных метода цитологической и иммунологической верификации диагноза множественной миеломы:

- 1) электрофорез белков сыворотки крови и мочи;
- 2) иммунофиксация белков сыворотки крови и мочи;
- 3) морфологическое исследование клеток костного мозга.

Однако в связи с развитием научно-практической медицины, появлением высокоэффективных методов лечения ММ, внедрением в практику таргетных препаратов для лечения этого заболевания появилась необходимость более глубокого анализа структуры и свойств миеломных клеток. С

этой целью необходимо оценивать aberrантный фенотип моноклональных плазматических клеток [4–16].

Наиболее точным и информативным методом определения aberrантного фенотипа является иммунофенотипирование клеток костного мозга методом проточной цитофлуориметрии. Научные и практические возможности этого метода диагностики при множественной миеломе можно подразделить на следующие направления:

1. Возможность выявить и дать четкую характеристику миеломных клеток, даже если субстрат болезни минимален [10].
2. Выявление маркеров, значимых для определения прогноза течения заболевания и ответа на химиотерапию [17; 18].
3. Дифференциальная диагностика множественной миеломы, моноклональных гаммапатий неясного значения, лимфом и реактивных состояний [4; 19].
4. Мониторинг минимальной остаточной (резидуальной) болезни после проведения терапии [4–7; 13; 20].
5. Создание новых таргетных препаратов, мишенями для которых могут являться aberrантные маркеры миеломных клеток [5; 21–24].

По данным литературы сегодня предложено большое число маркеров для определения плазматических клеток. Обычно рекомендации в качестве каркасных маркеров для идентификации и количественной оценки плазматических клеток включают определение CD38, CD138 и CD45 (наряду с характеристиками светорассеяния). Дополнительными маркерами в этом случае могут являться CD19, CD56, CD117, CD20, CD28, CD27, CD81, CD200, CyIgк, CyIgλ и β2-микроглобулин. Нормальные и патологические плазматические клетки различаются по частоте экспрессии этих антигенов (табл. 1).

Консорциумом «ЕвроФлоу» (*Euroflow*) в 2012 г. разработана панель из 12 МКА в 8-цветной проточной цитометрии (2 пробы).

Отобрано 4 каркасных маркера (CD38, CD138, CD45, CD19) для эффективного обнаружения плазматических клеток (CD38, CD138) и разграничения нормальных/реактивных от клональных плазматических клеток (CD19, CD38, CD45).

Остальные 8 маркеров использованы для более подробной характеристики плазматических клеток. В предложенном иммунодиагностическом подходе дополнительные антитела равномерно разделены на 2 пробы:

- 1 – CD56, β2-микроглобулин, CyIgк и CyIgλ;
- 2 – CD27, CD28, CD81, CD117.

Пробы 1 достаточно для специфической идентификации, количественной оценки плазматических клеток и их разделения на нормальные/реактивные и патологические (с aberrантным иммунофенотипом).

Таблица 1
 Экспрессия антигенов на плазматических клетках в норме и при множественной миеломе (цит. по A. Rawstronet al., 2008, [13] с измен.)

| Антиген | Экспрессия на нормальных плазматических клетках | Уровень экспрессии на нормальных плазматических клетках | Аберрантная экспрессия | Частота случаев множественной миеломы с аберрантной экспрессии |
|---------|---|---|------------------------|--|
| CD19 | + | >70 % | – | 95 % |
| CD56 | – | <15 % | + | 75 % |
| CD117 | – | 0 % | + | 30 % |
| CD20 | – | 0 % | + | 30 % |
| CD28 | –/слабая экспрессия | <15 % | + | 15–45 % |
| CD27 | + | 100 % | –/слабая экспрессия | 40–50 % |
| CD81 | + | 100 % | –/слабая экспрессия | нет данных |
| CD200 | слабая экспрессия | | + | нет данных |

Проба 2 может быть использована по показаниям для более подробной характеристики (табл. 2) плазматических клеток [25].

С появлением новых методов диагностики и мониторинга эффективности лечения ММ (оценка аберрантного фенотипа плазматических клеток с помощью иммунофенотипирования, оценка клональности свободных легких цепей) появились новые возможности более точной характеристики злокачественных клеток множественной миеломы, определения прогноза заболевания и оценки эффективности лечения, в особенности – верификации ремиссии заболевания.

Таким образом, оценка клинической значимости изучения аберрантного иммунофенотипа клеток множественной миеломы является актуальной зада-

Таблица 2

Панель антител для диагностики плазмноклеточных опухолей «ЕвроФлоу» 2012

| РacBlue\ V450 | РacOr\ V500 | FITC | PE | PE-су5 | Pe-су7 | APC | APC-H7 |
|---------------|-------------|------|------|----------|--------|------------|-------------|
| CD45 | CD138 | CD38 | CD56 | B2-micro | CD19 | суIg-kappa | суIg-lambda |
| CD45 | CD138 | CD38 | CD28 | CD27 | CD19 | CD117 | CD81 |

чей онкогематологии, так как позволит усовершенствовать диагностический процесс (отбор наиболее важных маркеров) и проводить иммунологический мониторинг эффективности терапии.

Материалы и методы

В настоящее исследование включены данные клинического анализа и иммунофенотипирования клеток костного мозга 64 первичных больных множественной миеломой, наблюдавшихся в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2004 по 2015 годы.

Согласно национальным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению множественной миеломы от 2014 года, одобренными Национальной всеобщей онкологической сетью, NCCN [23], обследование пациентов проводилось в следующем объеме:

- клинический анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы,
- биохимический анализ крови,
- определение уровня β 2-микроглобулина в сыворотке крови,
- электрофорез и иммунофиксация белков сыворотки крови и суточной мочи с количественным определением уровня М-градиента,
- исследование уровня свободных легких цепей Ig в сыворотке крови,
- морфологическое исследование аспирата костного мозга и трепано-биоптата,
- рентгенография костей скелета, включая
 - череп,
 - ребра,
 - грудину,
 - ключицы,
 - лопатки,
 - все отделы позвоночника,

- кости таза,
плечевые и бедренные кости,
- компьютерная и магнитно-резонансная томографии костей в качестве дополнительных обследований при отдельных показаниях,
 - цитогенетическое исследование плазматических клеток (кариотипирование и FISH) для выявления наиболее важных неблагоприятных цитогенетических аномалий: t(4;14), t(11;14), t(14;16), del 17p13, del 13q мы также проводили в качестве дополнительного обследования.

Всем 64 больным было проведено иммунофенотипирование клеток аспирата костного мозга с использованием панели CD138/CD38/CD45/CD19/CD56 и моноклонального цитоплазматического Ig.

Иммунофенотипирование клеток костного мозга проводилось в лаборатории иммунологии гемопоэза (руководитель – проф. Н.Н. Тупицын).

На первом этапе на основе проточно-цитометрических критериев (характеристики светорассеяния, коэкспрессия CD38 и CD138) в аспирате костного мозга выделяли популяцию плазматических клеток. Далее в гейте плазмочитов CD38⁺CD138⁺ методом трехцветной проточной цитометрии изучена экспрессия маркеров aberrантного иммунофенотипа плазматических клеток CD45, CD56 и CD19.

Стадирование множественной миеломы мы проводили по классификации В. Durie и S. Salmon, предложенной в 1975 г., и по международной системе стадирования, основанной на важном прогностическом значении сочетания β2-микроглобулина и альбумина сыворотки крови.

Лечение больных проводили согласно национальным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению множественной миеломы от 2014 года, одобренным NCCN [23].

При лечении первичных больных множественной миеломой моложе 65 лет без серьезной сопутствующей патологии проводилась индукционная химиотерапия, далее при достижении ремиссии проводили высокодозную химиотерапию с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток.

Больным старше 65 лет или молодым пациентам с тяжелой сопутствующей патологией проводили химиотерапию, **не** включающую ВХТ с трансплантацией аутологичных ГСК (табл. 3).

После проведения первой линии терапии первичным больным множественной миеломой мы оценивали результат лечения согласно единым критериям ответа на терапию, разработанным Международной рабочей группой по изучению множественной миеломы (2014 год).

Таблица 3

Терапия, проводимая первичным больным множественной миеломой

| Вариант лечения | Число больных | Процент больных |
|---|---------------|-----------------|
| ХТ с бортезомибом | 24 | 40 |
| ХТ без бортезомиба | 12 | 20 |
| ХТ с бортезомибом+ВХТ | 12 | 20 |
| ХТ без бортезомиба+ВХТ | 5 | 8,3 |
| ХТ без бортезомиба+ХТ с бортезомибом | 7 | 11,7 |

Отдаленные результаты лечения при множественной миеломе оценивали по следующим критериям:

- общая выживаемость,
- выживаемость без прогрессирования заболевания.

Общая выживаемость – период времени от установления диагноза до смерти от любой причины или до даты последней явки больного.

Выживаемость без прогрессирования заболевания – период времени от начала лечения до прогрессирования заболевания или смерти (независимо от причины смерти).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы SPSS Statistics, версия 21, на основе созданной в отделении химиотерапии гемобластозов базы данных. Оценка включала корреляционный анализ, анализ по таблицам сопряженности признаков с применением критерия χ^2 . Для определения статистической значимости различий средних значений количественных показателей у групп больных (по % количеству клеток с aberrантными маркерами CD45, CD19 и CD56 на плазматических клетках) использован Т-критерий Стьюдента. Построение кривых выживаемости осуществлено по методике Kaplan-Meier. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ углубленных молекулярных и иммунологических признаков возможен только в контексте их использования и сопоставления со стандартными критериями оценки распространенности заболевания и прогноза.

В исследовании мы проанализировали прогностическую значимость общепринятых факторов прогноза при множественной миеломе:

- уровень $\beta 2$ -микроглобулина сыворотки крови,
- уровень СРБ сыворотки крови,
- уровень альбумина сыворотки крови,
- уровень свободного кальция сыворотки крови,
- уровень ЛДГ сыворотки крови,
- наличие или отсутствие анемии,
- наличие или отсутствие почечной недостаточности,
- наличие или отсутствие экстрамедуллярных очагов поражения,
- наличие плазмобластов в миелограмме.

В условиях современной терапии ряд стандартных факторов прогноза утратили свое значение.

Сохранили прогностическое значение анемия, почечная недостаточность и наличие экстрамедуллярных очагов поражения (рис. 1).

Совершенно очевидно, что существует объективная необходимость дополнения и расширения общепринятых клинических и лабораторных прогностических факторов молекулярными и иммунологическими критериями aberrантности, углубленной характеристики злокачественных плазмочитов при множественной миеломе.

По этим причинам представляется вполне обоснованным проведение анализа взаимосвязи между aberrантностью по маркерам CD45, CD19, CD56 и клинико-лабораторными показателями, ответом на лечение и прогнозом заболевания у пациентов, страдающих множественной миеломой.

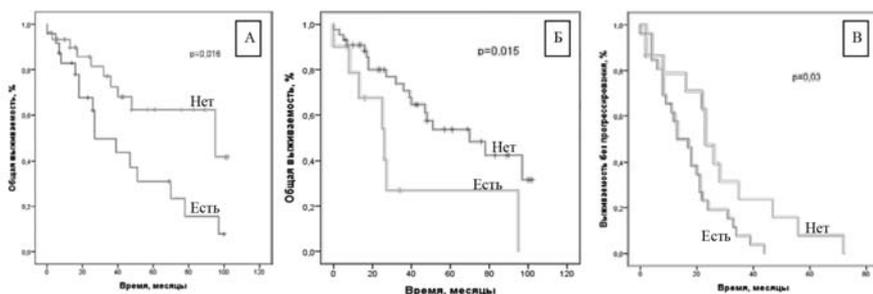


Рисунок 1. А: общая выживаемость в зависимости от наличия или отсутствия экстрамедуллярных очагов поражения ($p = 0,016$); Б: общая выживаемость в зависимости от наличия или отсутствия почечной недостаточности ($p = 0,015$); В: выживаемость без прогрессирования больных ММ в зависимости от наличия или отсутствия анемии ($p = 0,03$).

Следует отметить, что подобные взаимосвязи действительно существуют. То есть, к морфологическому определению плазмоцитов в костном мозге может быть добавлен надежный количественный критерий, указывающий, насколько эти плазмоциты имеют «нормальные» (свойственные обычным плазмоцитам) или «аберрантные» (свойственные клеткам множественной миеломы) иммунофенотипические характеристики.

Подобного рода анализ проведен впервые, и он оказался успешным в отношении всех трех изученных маркеров (CD45, CD19, CD56): нарастание признаков аберрантности сопровождалось нарастанием гематологических, биохимических, клинических и прогностически неблагоприятных симптомов множественной миеломы. Однако для каждого из оцененных признаков (CD45, CD19, CD56) эти проявления имели свою специфику.

Оценка экспрессии маркера CD45 (табл. 4).

У 43 больных (67,2 %) диагностирован аберрантный (CD45⁻) иммунофенотип плазматических клеток.

У 12 больных (18,8 %) наблюдался смешанный по CD45 фенотип, когда наряду с аберрантными присутствовали нормальные по иммунофенотипу плазмоциты (количество CD45⁻ плазматических клеток 20–80 %).

У 9 больных (14,1 %) количество CD45⁻ плазматических клеток составляло 0–20 %, т.е. определялся «нормальный» по CD45 иммунофенотип плазматических клеток.

Таблица 4

Группы пациентов с различными ИФТ по CD45

| ИФТ по CD45 | Процент CD45-ПК | Число больных, абсолютное (%) |
|--------------------|------------------------|--------------------------------------|
| Аберрантный | 80–100 | 43 (67,2%) |
| Смешанный | 20–80 | 12 (18,8%) |
| Нормальный | 0–20 | 9 (14,1%) |

Оценка экспрессии маркера CD19 (табл. 5)

У 54 больных (84,4 %) определялся аберрантный по CD19 иммунофенотип плазматических клеток, то есть отсутствие на них данного антигена.

В 7,8 % случаев наблюдался смешанный по CD19 иммунофенотип (присутствовали нормальные и аберрантные по CD19 плазмоциты).

В 6,4 % случаев количество аберрантных по CD19 плазматических клеток не превышало 20 %, т.е. определялся нормальный CD19⁺ иммунофенотип.

Таблица 5

Группы пациентов с различными ИФТ по CD19

| ИФТ по CD19 | Процент CD19-ПК | Число больных, абсолютное (%) |
|-------------|-----------------|-------------------------------|
| Аберрантный | 80–100 | 54 (84,4 %) |
| Смешанный | 20–80 | 5 (7,8 %) |
| Нормальный | 0–20 | 4 (6,3 %) |

Оценка экспрессии маркера CD56 (табл. 6)

У 42 больных (65,6 %) диагностирован аберрантный иммунофенотип плазматических клеток (положительная экспрессия антигена).

У 9 больных (14,1 %) наблюдалась экспрессия маркера CD56 на части клеток (на 20–80 %), т.е. определялся смешанный по CD56 фенотип.

У 13 больных (20,3 %) количество CD56⁺ плазматических клеток составляло 0–20 %, т.е. наблюдался нормальный CD56⁻ иммунофенотип.

Помимо выделения трех групп иммунофенотипов у больных по каждому из маркеров (аберрантный, нормальный, смешанный), мы уделили большое внимание более детальному анализу того факта, какая составляющая злокачественного клона имеет максимальное клиническое значение, нормальная по фенотипу или аберрантная.

С этой целью наличие от 0 до 80 % аберрантных клеток мы трактовали как случаи с присутствием нормального иммунофенотипа. Согласно данным литературы, присутствие нормальных плазмочитов в злокачественном клоне клеток множественной миеломы (и нарастание пропорции этих клеток в процессе терапии) является прогностически благоприятным феноменом.

Напротив, ситуации присутствия от 20 до 100 % плазмочитов мы трактовали как наличие той или иной пропорции злокачественных аберрантных плазмочитов.

Далее будут обсуждены клиническое значение в зависимости от типа маркера.

Таблица 6

Группы пациентов с различными ИФТ по CD56

| ИФТ по CD56 | Процент CD56 ⁺ ПК | Число больных, абсолютное (%) |
|-------------|------------------------------|-------------------------------|
| Аберрантный | 80–100 | 42 (65,6 %) |
| Смешанный | 20–80 | 9 (14,1 %) |
| Нормальный | 0–20 | 13 (20,3 %) |

Значение имеет как «присутствие нормальных плазматических клеток», так и «наличие aberrантного иммунофенотипа».

Так, для маркера CD19 выявлена достоверная взаимосвязь aberrантного CD19⁻ иммунофенотипа с более высоким количеством миеломных клеток у больных ММ.

Чем ниже количество CD19⁺ плазмоцитов, тем больше процент клеток плазмочитарного ряда в костном мозге, следовательно, тем больше объем и распространенность опухолевого заболевания: у больных с «присутствием нормальных плазматических клеток» среднее количество клеток плазмочитарного ряда по данным миелограммы составило 15,15±3,26 % (n=10), у больных с aberrантным по CD19 иммунофенотипом – 46,03±3,25 % (n=53), различия достоверны: p=0,000.

Более того, aberrантный по CD19 иммунофенотип ассоциирован с наличием плазмобластов среди клеток плазмочитарного ряда в отличие от нормального CD19⁺ иммунофенотипа, при котором плазмобластная морфология плазматических клеток вообще не наблюдалась, p=0,034.

Помимо этого, aberrантный по CD19 иммунофенотип плазматических клеток ассоциирован с наличием проплазмоцитов среди клеток плазмочитарного ряда в отличие от фенотипа с «присутствием нормальных плазматических клеток» по CD19, при котором проплазмоциты практически отсутствуют. У больных с «присутствием нормальных плазматических клеток» (CD19⁻ ПК 0–80 %) среднее количество проплазмоцитов составило 1,22±0,64 % (n=9), у больных с aberrантным CD19⁻ фенотипом среднее количество проплазмоцитов составило 15,88±2,93 % (n=44), p=0,029.

И наконец выявлена достоверная взаимосвязь aberrантного по CD19 иммунофенотипа плазмоцитов с более высоким количеством плазматических клеток со зрелой морфологией. У больных с полностью aberrантным по CD19 иммунофенотипом среднее количество плазматических клеток составило 28,6±3,42 % (n=44), а при наличии пропорции клеток с «нормальным» фенотипом – 13,89±3,14 % (n=9), p=0,003 (табл. 7).

Морфологический вариант клеток плазмочитарного ряда взаимосвязан с aberrантностью по CD56. Для нормального CD56⁻ иммунофенотипа характерна плазмобластная морфология клеток плазмочитарного ряда – 67 % случаев, а при наличии aberrантности – в 33 % случаев. Признаки взаимосвязаны, p=0,009 (табл. 8).

Установлена четкая связь aberrантности плазматических клеток по маркерам CD56 и CD45 с уровнями общего белка, парапротеина, свободных легких цепей в сыворотке крови, а также белка Бенс-Джонса в моче.

Взаимосвязь более высокой концентрации общего белка сыворотки крови у больных с экспрессией CD56 плазматическими клетками близка к достовер-

Таблица 7

Взаимосвязь показателей миелограммы у больных ММ с aberrантностью по CD19 на плазматических клетках

| Показатель миелограммы | Группы больных по уровню экспрессии CD19 на ПК | | |
|--------------------------------|--|-------------------------|-------|
| | ИФТ с присутствием нормальных ПК по CD19 | Аберрантный по CD19 ИФТ | P |
| Клетки плазмочитарного ряда, % | 15,15±3,26 (n=10) | 46,03±3,25 (n=53) | 0,000 |
| Плазмобласты, % | 0±0 (n=9) | 0,39±0,18 (n=45) | 0,034 |
| Проплазмоциты, % | 1,22 ± 0,64 (n = 9) | 15,88 ± 2,93 (n = 44) | 0,000 |
| Плазматические клетки, % | 13,89 ± 3,14 (n = 9) | 28,6 ± 3,42 (n = 44) | 0,003 |

Таблица 8

Сопряженность показателей миелограммы с aberrантностью по CD56 на плазматических клетках

| Показатель миелограммы | | Группы больных по CD56 ИФТ | | | Итого |
|------------------------|-----|----------------------------|-----------|------------|-----------|
| | | аберрантный | смешанный | нормальный | |
| Плазмобласты | нет | 33 (67,3%) | 9 (18,4%) | 7 (14,3%) | 49 (100%) |
| | да | 2 (33,3%) | 0 | 4 (66,7%) | 6 (100%) |

ной и заключается в том факте, что при aberrантном по CD56 иммунофенотипе средняя концентрация общего белка составила 104±4,4 (n = 40), а у больных с присутствием нормальных ПК по маркеру CD56 – 90,9±5,1 (n = 22), p = 0,057.

Концентрация парапротеина также была более высокой при aberrантном по CD56 иммунофенотипе. У больных с «присутствием нормальных плазматических клеток» (CD56+ ПК 0–80 %) среднее значение моноклонального белка в

сыворотке крови составило $24,07 \pm 4,08$ г/л ($n = 22$), а у больных с аберрантным по CD56 фенотипом – $39,44 \pm 4,35$ г/л ($n = 42$). Различия достоверны: $p = 0,013$.

Согласно рекомендациям, разработанным международной рабочей группой по изучению множественной миеломы (International Myeloma Working Group), нормальная концентрация свободных легких цепей к-типа составляет $3,3–19,4$ мг/л, СЛЦ $\lambda – 5,7–26,3$ мг/л. Нормальное соотношение СЛЦ к/λ колеблется от 0,26 до 1,65. Наиболее объективным и точным показателем является определение соотношения СЛЦ к/λ.

В нашей работе повышенные значения к-СЛЦ были выявлены у 20 пациентов и колебались от 24,1 мг/л до 23 040,0 мг/л, медиана составляла 254,95 мг/л.

У 13 больных был повышен уровень λ-СЛЦ, их значения находились в диапазоне от 30,31 мг/л до 12 023 мг/л, медиана составляла 573,3 мг/л.

Отклонение от нормы соотношения к/λ СЛЦ при λ-типе парапротеина колебалось в диапазоне от 0,09 до 0,001, медиана – 0,004.

При к-типе моноклонального белка нарушение соотношения к/λ СЛЦ колебалось в диапазоне от 2,45 до 32 914,00, медиана – 114,550.

У одного больного соотношение к/λ СЛЦ находилось в пределах нормы (1,490), что говорит о несекретирующем варианте множественной миеломы, результаты этого метода исследования совпали с результатами иммунохимического исследования белков сыворотки крови и мочи. Интересный момент интерпретации результатов исследования СЛЦ заключается в том, что отклонение от нормы уровня к и/или λ СЛЦ наблюдалось у всех больных, в том числе – и у пациента с несекретирующим типом множественной миеломы, и поэтому не является настолько точным и объективным показателем, как нарушение соотношения к/λ СЛЦ.

Аберрантный по CD56 иммунофенотип плазматических клеток ассоциирован с более низким уровнем СЛЦ к-типа в отличие от фенотипа с «присутствием нормальных плазматических клеток» по CD56: в среднем 7203 и 544 мг/л, $p=0,01$. По-видимому, не только пропорция аберрантных плазматических клеток в злокачественном клоне играет роль в секреции свободных легких цепей при множественной миеломе (табл. 9).

Белок Бенс-Джонса в моче на этапе первичной диагностики множественной миеломы выявлен у 35 из 60 больных. Его концентрация была в диапазоне от 0,01 до 12,3 г/24ч, среднее значение составляло 2,14 г/24ч, медиана 0,92 г/24ч.

Аберрантный по CD45 иммунофенотип плазматических клеток был ассоциирован с протеинурией по белку Бенс-Джонса. У больных с нормальным CD45⁺ иммунофенотипом, среднее суточное количество белка Бенс-Джонса в моче составило $0,084 \pm 0,056$ ($n = 9$), а у больных с «наличием аберрантного иммунофенотипа» (CD45-ПК 20–100 %) – $1,41 \pm 0,357$ ($n = 51$). Различия достоверны: $p = 0,001$ (табл. 10).

Таблица 9
Взаимосвязь количественных показателей, характеризующих парапротеинемию у больных ММ с aberrантностью по CD56 на ПК

| Показатель | Группы больных по CD56 ИФТ | | |
|-----------------------------------|--|-------------------------|-------|
| | ИФТ с присутствием нормальных ПК по CD56 | Аберрантный по CD56 ИФТ | p |
| Общий белок, г/л | 90,9±5,1 (n=22) | 104±4,4 (n=40) | 0,057 |
| М-градиент в сыворотке крови, г/л | 24,07±4,08 (n=22) | 39,44±4,35 (n=42) | 0,013 |
| СЛЦ к-типа, мг/л (при ММ к-типа) | 7203±3442,8 (n=6) | 544±210,3 (n=13) | 0,010 |

Таблица 10
Взаимосвязь уровня белка Бенс-Джонса в моче с aberrантностью по CD45 на плазматических клетках

| Показатель | Группы больных по CD45 ИФТ | | |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------|
| | Нормальный по CD45 ИФТ | Наличие aberrантного по CD45 ИФТ | p |
| Белок Бенс-Джонса в моче, г/24ч | 0,084±0,056 (n=9) | 1,41 ± 0,357 (n=51) | 0,001 |

Согласно рекомендациям международной рабочей группы по изучению множественной миеломы от 2014 года почечная недостаточность констатируется при повышении уровня креатинина сыворотки крови до 177 мкмоль/л и более или при снижении клиренса креатинина <40 мл/мин. В нашем исследовании почечная недостаточность диагностирована у 14 больных множественной миеломой (21,9 %); у 50 пациентов (78,1 %) на этапе первичной диагностики почечной недостаточности не было.

Отметим, что в группе больных, страдавших почечной недостаточностью, мы выявили некоторые интересные факты.

У больных, страдавших почечной недостаточностью, уровень креатинина мочевины в сыворотке крови был повышен от 194 мкмоль/л до 926 мкмоль/л, среднее значение составляло 478,14 мкмоль/л.

У больных, страдавших почечной недостаточностью, также был повышен уровень мочевины в сыворотке крови от 8,5 ммоль/л до 25,0 ммоль/л, среднее значение составляло 16,6 ммоль/л.

Показатели мочевины и креатинина были связаны с aberrантностью плазматических клеток по CD19 и CD45.

У больных с нормальным CD45⁺ иммунофенотипом среднее значение уровня креатинина в сыворотке крови составило 97,4±16,5 мкмоль/л, а у больных с «наличием aberrантного иммунофенотипа» (CD45-ПК 20–100 %) – 184,9±28,6 мкмоль/л (n = 54). Различия достоверны: p=0,011. Таким образом, выявлена взаимосвязь aberrантного по CD45 иммунофенотипа плазматических клеток с более высоким уровнем креатинина – одного из основных признаков почечной недостаточности.

При полностью aberrантном по CD19 иммунофенотипе плазматических клеток достоверно наблюдался более высокий уровень креатинина в сравнении со случаями, при которых не все плазматические клетки были отрицательными по CD19: 190±29,6 мкмоль/л и 91,8±8,6 мкмоль/л соответственно, p=0,002.

Аналогично полностью aberrантный по CD19 иммунофенотип плазматических клеток больных был ассоциирован с более высоким уровнем мочевины в сыворотке крови в сравнении со случаями обнаружения пропорции миеломных клеток с нормальным по CD19 иммунофенотипом: 10,1±1 ммоль/л и 6,8±1,1 ммоль/л, p=0,048.

Таким образом, можно сделать следующий вывод: aberrантный CD19-иммунофенотип плазматических клеток ассоциирован с более высокими показателями уровня креатинина и мочевины, что в свою очередь говорит о наличии взаимосвязи с почечной недостаточностью.

Заслуживает особого внимания связь aberrантности по маркерам CD19 и CD45 при множественной миеломе с уровнями C-реактивного белка и β2-микроглобулина в сыворотке крови. Один из них отражает биологическую активность интерлейкина-6, основного фактора роста для клеток множественной миеломы, а другой является важным прогностическим признаком, отражающим опухолевую массу при множественной миеломе. Уровень СРБ был взаимосвязан с aberrантностью плазматических клеток по CD19, а β2-микроглобулина – с уровнем экспрессии маркера CD45.

Уровень β2-микроглобулина сыворотки крови отражает количество опухолевой массы и почечную функцию при множественной миеломе и поэтому также является важным прогностическим фактором и включен в Международную систему стадирования ММ. В нашем исследовании уро-

вень β_2 -микроглобулина находился в пределах нормальных значений ($<3,5$ мг/л) у 21 больного (38,9 %). Значение уровня β_2 -микроглобулина в пределах от 3,5 до 5,5 мг/л, что соответствует II стадии заболевания по ISS, определялось у 16 больных (29,6 %). Уровень β_2 -микроглобулина, превышающий 5,5 мг/л, что соответствует III стадии множественной миеломы по ISS, определялся у 17 пациентов (31,5 %).

Наличие aberrантного по CD45 иммунофенотипа плазматических клеток, в отличие от нормального CD45⁺ фенотипа, ассоциировано с более высоким уровнем β_2 -микроглобулина. У больных с нормальным CD45⁺ иммунофенотипом, среднее значение β_2 -микроглобулина в сыворотке крови составило $3,76 \pm 0,68$ ммоль/л (n=7), а у больных с «наличием aberrантного иммунофенотипа» (CD45⁻ ПК 20–100 %) среднее значение β_2 -микроглобулина составило $8,57 \pm 2,16$ ммоль/л (n=47), $p=0,038$ (табл. 11).

Мы выявили достоверную взаимосвязь aberrантного CD19⁻ иммунофенотипа с более высоким уровнем СРБ в сыворотке крови, являющимся важным

Таблица 11

Взаимосвязь клинически и прогностически значимых биохимических показателей у больных множественной миеломой с aberrантностью по CD45 и CD19 на плазматических клетках

| Показатель | Группы больных по CD45 ИФТ | | | Группы больных по CD19 ИФТ | | |
|--|----------------------------|----------------------------------|-------|--|--------------------------|-------|
| | Нормальный по CD45 ИФТ | Наличие aberrантного по CD45 ИФТ | p | ИФТ с присутствием нормальных ПК по CD19 | Aberrант-ный по CD19 ИФТ | p |
| β_2 -микроглобулин, ммоль/л | $3,76 \pm 0,68$ (n=7) | $8,57 \pm 2,16$ (n=47) | 0,038 | $4,48 \pm 0,96$ (n=9) | $8,73 \pm 2,3$ (n=44) | 0,095 |
| Креатинин, мкмоль/л | $97,4 \pm 16,5$ (n=9) | $184,9 \pm 28,6$ (n=54) | 0,011 | $91,8 \pm 8,6$ (n=10) | $190 \pm 29,6$ (n=52) | 0,002 |
| Мочевина, ммоль/л | $7,7 \pm 2$ (n=5) | $9,9 \pm 1$ (n = 37) | НА* | $6,8 \pm 1,1$ (n=6) | $10,1 \pm 1$ (n = 36) | 0,048 |
| *НА — не анализирована (недостаточная выборка больных) | | | | | | |

прогностическим фактором при множественной миеломе. То есть, чем больше выражена утрата маркера CD19 на плазматических клетках, тем уровень СРБ в сыворотке более высокий. У больных с уровнем СРБ сыворотки крови, превышающим нормальные значения (>6 мг/л), аберрантная по CD19 популяция плазматических клеток наблюдалась в 100 % случаев, смешанный и нормальный по CD19 фенотипы отсутствовали (0 %). У больных с нормальным уровнем СРБ в сыворотке крови (<6 мг/л), соответствующие цифры составили 72,2 %; 16,7 % и 11,1 %; $p = 0,047$. При оценке средних значений уровня С-реактивного белка в сыворотке крови эта взаимосвязь подтвердилась: у больных с присутствием нормальных плазматических клеток (0–80 %) среднее значение СРБ в сыворотке крови составило $1,85 \pm 0,35$ мг/л ($n=10$), а у больных с аберрантным по CD19 фенотипом – $10,45 \pm 2,6$ мг/л ($n = 44$), $p = 0,002$ (рис. 2).

Одной из характерных особенностей множественной миеломы наряду с повышением общего количества иммуноглобулинов является снижение уров-

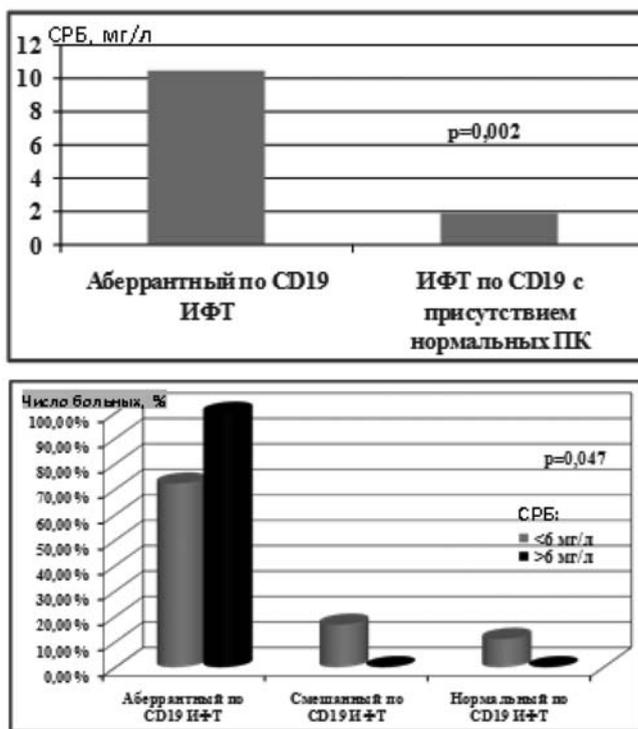


Рисунок 2. Взаимосвязь уровня СРБ с экспрессией CD19 на ПК.

ней нормальных иммуноглобулинов сыворотки крови. Это, в свою очередь, ассоциировано с достаточно частым развитием инфекционных осложнений у больных множественной миеломой. По этим причинам картина крови с развитием лейкоцитоза со сдвигом влево является достаточно часто встречающимся признаком у больных множественной миеломой.

В нашей работе лейкоцитоз наблюдался у 23 % больных, а сдвиг лейкоцитарной формулы влево – в 28,6 % случаев, что косвенно говорило о наличии инфекционного процесса, требующего дообследования, выявления очага инфекции и назначения специфической антибактериальной, противогрибковой или противовирусной терапии.

При оценке средних значений процента палочкоядерных нейтрофилов в лейкоцитарной формуле выявлена достоверная взаимосвязь aberrантного CD56⁺ иммунофенотипа с более редкими случаями сдвига лейкоцитарной формулы влево. У группы больных с «присутствием нормальных плазматических клеток» (CD56⁺ ПК 0–80 %) среднее значение процента палочкоядерных нейтрофилов от общего числа лейкоцитов составило 7,8±2,6 % (n=18), у больных с aberrантным CD56⁺ фенотипом среднее значение процента палочкоядерных нейтрофилов составило 3,5±0,6 % (n = 30). Различия близки к достоверным: p=0,053. Таким образом, из результатов статистического анализа можно сделать вывод о том, что aberrантный CD56⁺ иммунофенотип плазматических клеток ассоциирован с более низким процентом палочкоядерных нейтрофилов, т.е. с более редкими случаями сдвига лейкоцитарной формулы влево. Вероятнее всего, это может говорить о более редких случаях инфекционных процессов у этой группы больных, что является клинически благоприятным фактором.

У 4 больных (8 %) в лейкоцитарной формуле были выявлены плазматические клетки. У 2 пациентов процент плазматических клеток был низкий: 1 % и 2 %. У 2 больных процент плазматических клеток составил более 20 % (34,8 % и 70,0 %), что говорило о наличии плазмноклеточного лейкоза. Плазмноклеточный лейкоз устанавливается при количестве плазматических клеток более 20 % в лейкоцитарной формуле или при абсолютном количестве плазматических клеток более 2×10^9 /л. Установлена взаимосвязь между присутствием плазматических клеток в крови и CD56⁻ иммунофенотипом, p=0,011. В двух случаях с количеством плазматических клеток в периферической крови 34,8 % и 70 %, относящихся к плазмноклеточному лейкозу, варианту множественной миеломы, наблюдался нормальный CD56⁻ фенотип плазматических клеток.

Aberrантность плазматических клеток по маркеру CD45 имела связь с более низким общим количеством нейтрофилов в периферической крови (p = 0,034), с меньшим процентным количеством сегментоядерных форм нейтрофилов (p = 0,02), а также метамиелоцитов (p = 0,04).

Таблица 12

Ответ на терапию первой линии у больных множественной миеломой

| Ответ на терапию | Число больных | Процент больных |
|------------------|---------------|-----------------|
| ПР | 10 | 21,7 |
| ОХЧР | 10 | 21,7 |
| ЧР | 15 | 32,6 |
| Стабилизация | 8 | 17,4 |
| Прогрессирование | 3 | 6,5 |

После проведения терапии первой линии первичным больным множественной миеломой результат лечения был оценен у 46 пациентов. Эффективность терапии составила 76 %. У 10 больных (21,7 %) достигнута полная ремиссия, у 10 пациентов (21,7%) – очень хорошая частичная ремиссия, у 15 больных (32,6 %) – частичная ремиссия, у 8 (17,4%) – стабилизация, а у 3 пациентов (6,5 %) на фоне проводимой химиотерапии наблюдалось прогрессирование заболевания (табл. 12).

При медиане наблюдения 31 месяц медиана общей выживаемости составила 51 месяц (от 0 до 102). Показатель выживаемости без прогрессирования колебался от 0 до 72 месяцев, медиана ВБП составила 18 месяцев (рис. 3).

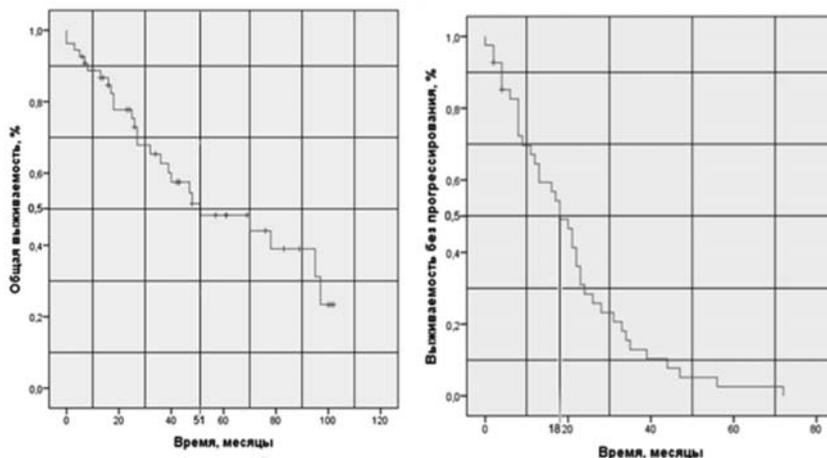


Рисунок 3. Оценка показателей выживаемости (ОВ и ВБП) у больных множественной миеломой.

Результаты лечения по нашим данным были определенным образом взаимосвязаны с aberrантностью плазматических клеток. Aberrантный по CD45 иммунофенотип плазматических клеток, в отличие от нормального CD45⁺ фенотипа, ассоциирован с худшим ответом на лечение и менее благоприятным прогнозом заболевания (табл. 13).

Таблица 13
Взаимосвязь ответа на терапию первой линии с aberrантностью по CD45 на плазматических клетках

| Ответ на терапию | | Группы больных по CD45 ИФТ | | | Итого | p |
|------------------|------|----------------------------|----------------------|-----------------------|------------|-------|
| | | Aberrантный по CD45ИФТ | Смешанный по CD45ИФТ | Нормальный по CD45ИФТ | | |
| ПР | есть | 4 (40 %) | 2 (20 %) | 4 (40 %) | 10 (100 %) | 0,012 |
| | нет | 28 (77,8 %) | 6 (16,7 %) | 2 (5,6 %) | 36 (100 %) | |

При анализе ОВ больных с количеством CD45⁻ плазматических клеток от 0 до 20 % (нормальным фенотипом), в сравнении с пациентами, у которых имела место aberrантность иммунофенотипа (20–100 %), различия близки к достоверным: 95 и 47 месяцев, $p=0,111$. Следовательно, при нормальном по CD45 иммунофенотипе миеломных клеток отмечается отчетливая тенденция к более высоким показателям ОВ и более благоприятному прогнозу заболевания по сравнению с aberrантным по CD45 фенотипом или с утратой экспрессии антигена CD45 на части плазматических клеток (рис. 4).

Сам факт присутствия даже частичной aberrантности по CD45 (20–100 %) существенно ухудшает прогноз: медианы выживаемости без прогрессирования у больных с наличием aberrантного иммунофенотипа и с нормальным по CD45 фенотипом составили 18 и 23 месяцев соответственно.

Нами не установлено связи aberrантности по CD19 с прогнозом при множественной миеломе, что, возможно, связано с недостаточной выборкой больных.

Напротив, aberrантный по CD56 иммунофенотип плазматических клеток в отличие от нормального CD56⁻ фенотипа ассоциирован с более хорошим ответом на лечение и более благоприятным прогнозом заболевания. Это, пожалуй, единственный маркер aberrантности, который является благоприят-

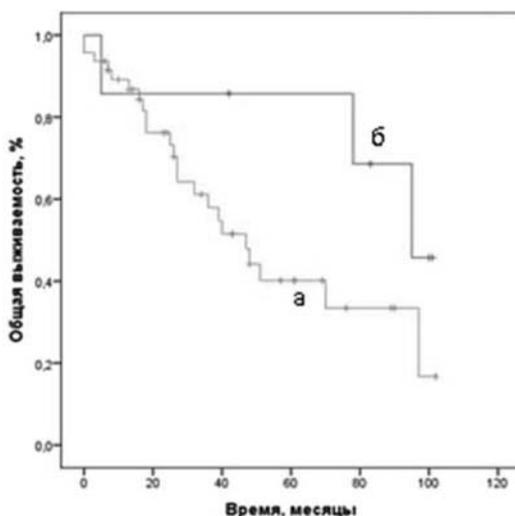


Рисунок 4. Общая выживаемость больных множественной миеломой с «наличием aberrантного иммунофенотипа» (а) и с нормальным по CD45 фенотипом (б).

ним фактором. В случаях CD56⁺ множественной миеломы ПР наблюдалась в 21,4%, ОХЧР – в 25 %, ЧР – в 39,3 % набл.дей. В случаях частичной aberrантности по CD56 частота ПР достигала 50 % (всего 6 больных). Это существенно превышает показатели у больных с нормальным фенотипом: ПР наблюдалась в 8,3 %, ОХЧР – в 16,7 %, ЧР – в 25 % случаев.

При нормальном CD56⁻ иммунофенотипе плазматических клеток наиболее частым ответом на лечение является стабилизация процесса – 41,7 %.

Анализ общей выживаемости подтвердил прогностически наиболее благоприятную роль aberrантности по CD56. Медиана ОВ у этих больных составила 95 месяцев.

В группе больных со смешанным по CD56 фенотипом – 78 месяцев, у больных с нормальным (CD56⁻) фенотипом – всего 25 месяцев. Статистические различия по лог-ранговому критерию достоверны: p=0,039.

Более достоверные различия наблюдались при сравнении ОВ в группах больных с нормальным фенотипом и наличием aberrантного иммунофенотипа (20–100 %). Медиана ОВ в этих группах – 25 месяцев и 95 месяцев соответственно. Статистические различия по лог-ранговому критерию достоверны: p=0,013.

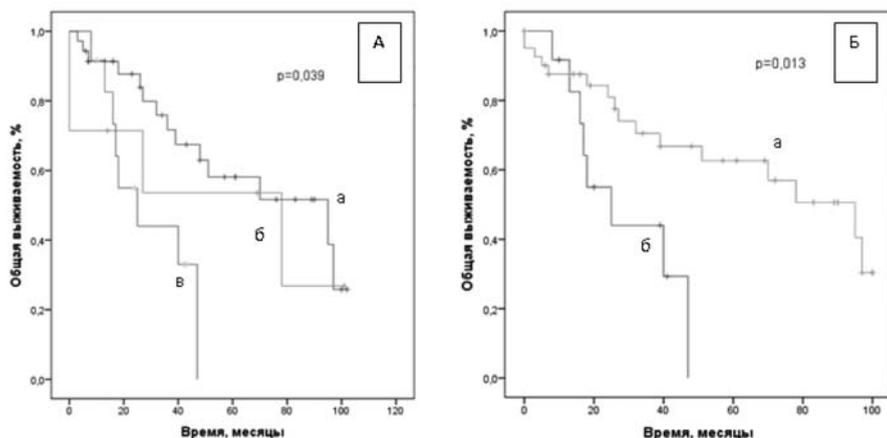


Рисунок 5. Общая выживаемость больных множественной миеломой в зависимости от aberrантности по CD56 на ПК. А: общая выживаемость больных ММ с aberrантным (а), смешанным (б) и нормальным (в) по CD56 иммунофенотипами ПК; Б: общая выживаемость больных ММ с «наличием aberrантного» (а) и с нормальным (б) по CD56 иммунофенотипами ПК.

Таким образом, нормальный CD56⁻ иммунофенотип миеломных клеток достоверно ассоциирован с более низкими показателями общей выживаемости и с менее благоприятным прогнозом заболевания по сравнению с aberrантным по CD56 фенотипом даже в случае экспрессии антигена CD56 на части плазматических клеток (рис. 5).

Если сопоставить выживаемость без прогрессирования у больных с нормальным по CD56 иммунофенотипом (0–20 %) и у больных наличием aberrантного иммунофенотипа (20–100 %), наблюдаются достоверные различия. Так, у больных с нормальным по CD56 негативным иммунофенотипом медиана ВВП составила 9 месяцев. А у больных с наличием aberrантности – 21 месяц. Статистические различия по лог-ранговому критерию достоверны: $p=0,038$. Следовательно, нормальный CD56⁻ иммунофенотип миеломных клеток ассоциирован с более низкими показателями выживаемости без прогрессирования и с менее благоприятным прогнозом заболевания по сравнению с aberrантным CD56 позитивным фенотипом или с экспрессией антигена CD56 на части плазматических клеток (рис. 6).

Таким образом, aberrантность плазматических клеток множественной миеломы по экспрессии маркеров CD19, CD45, CD56 имеет прямую связь

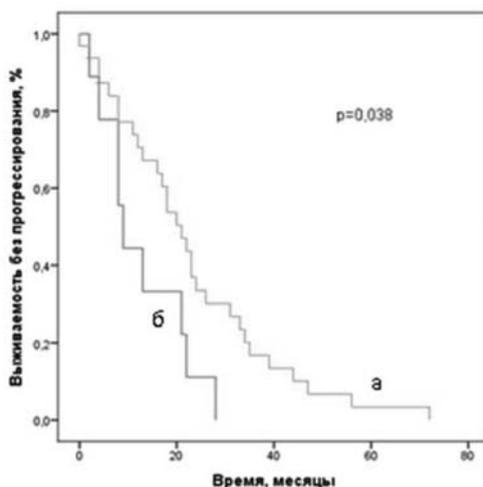


Рисунок 6. Выживаемость без прогрессирования у больных множественной миеломой, с «наличием aberrантного иммунофенотипа» (а) и с нормальным по CD56 фенотипом (б)

с клиническим течением, биохимическими особенностями (уровнем СРБ, β 2-микроглобулина, креатинина, мочевины), отражается на секреции моноклонального белка и морфологической характеристике злокачественных плазмочитов множественной миеломы. Все это находит отражение в эффективности терапии множественной миеломы, как при оценке непосредственного эффекта лечения, так и отдаленных результатов (выживаемость без прогрессирования, общая выживаемость). Всё сказанное свидетельствует о необходимости исследования aberrантности клеток множественной миеломы для уточнения диагноза, прогноза и улучшения на этой основе результатов лечения больных.

Литература

1. McKenna R.W., Kyle R.A., Kuehl W.M., Grogan T.M., Harris N.L., Coup-land R.W. (Eds: Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al.). Plasma cell neoplasms. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 2008:204-207.

2. *San Miguel J.F., Gutierrez N.C., Mateo G., Orfao A.* Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur. J. Cancer.* 2006;42(11):1510-1519.
3. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2013 г. (под редакцией академика РАН М.И. Давыдова и доктора биологических наук Е.М. Аксель) Ассоциация директоров центров и институтов онкологии, радиологии, рентгенологии государственных участников Содружества Независимых Государств 2015:1-217.
4. *Зуева Е.Е., Русанова Е.Б., Куртова А.В.* Диагностика множественной миеломы и мониторинг эффективности терапии. *Иммунология гемопоэза.* 2008;5(2):44-56.
5. *Bataille R, Jero G, Robillard N, et al.* The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica.* 2006;91(9):1234-40.
6. *de Tute RM, Jack AS, Child JA, et al.* A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. *Leukemia.* 2007;21(9):2046-9. doi: 10.1038/sj.leu.2404815.
7. *Johnsen HE, Bogsted M, Klausen TW, et al.* Multiparametric flow cytometry profiling of neoplastic plasma cells in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78B(5):338-47. doi: 10.1002/cyto.b.20523.
8. *Manzanera GM, San Miguel Izquierdo JF, de Matos OA.* Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Meth Mol Med.* 2005;113:5-24. doi: 10.1385/1-59259-916-8:5.
9. *Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, et al.* Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3661-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1489.
10. *Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, et al.* Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol.* 1998;152(6):1655-65.
11. *Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, et al.* New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smouldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood.* 2007;110(7):2586-92. doi: 10.1182/blood-2007-05-088443.
12. *Rawstron AC, Davies FE, Das Gupta R, et al.* Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: The relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood.* 2002;100(9):3095-100. doi: 10.1182/blood-2001-12-0297.

13. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008;93(3):431–8. doi: 10.3324/haematol.11080.
14. Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood*. 2005;105(12):4845–8. doi: 10.1182/blood-2004-12-4700.
15. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: A tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*. 2002;99(5):1853–6. doi: 10.1182/blood.v99.5.1853.
16. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica*. 2001;86(8):837–43.
17. Moreau P, Robillard N, Avet-Loiseau H, et al. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica*. 2004;89(5):547–51.
18. Pellat-Deceunynck C, Barille S, Jego G, et al. The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia*. 1998;12(12):1977–82. doi: 10.1038/sj.leu.2401211.
19. Jego G, Avet-Loiseau H, Robillard N, et al. Reactive plasmacytoses in multiple myeloma during hematopoietic recovery with G- or GM-CSF. *Leuk Res*. 2000;24(7):627–30. doi: 10.1016/s0145-2126(00)00033-3.
20. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005;90(10):1365–72.
21. Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, et al. Requirements of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. *Blood*. 2002;99(6):2172–8. doi: 10.1182/blood.v99.6.2172.
22. Robillard N, Wulleme S, Lode L, et al. CD33 is expressed on plasma cells of a significant number of myeloma patients, and may represent a therapeutic target. *Leukemia*. 2005;19(11):2021–2. doi: 10.1038/sj.leu.2403948.
23. Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, et al. Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4- DM1 against CD138+ multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;104(12):3688–96. doi: 10.1182/blood-2004-03-0963.
24. Treon SP, Raje N, Anderson KC. Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies. *Semin Oncol*. 2000;27(5):598–613.

25. *Тупицын Н.Н.* Иммунология клеток крови. В кн.: Гематология. Национальное руководство. Под ред. О.А. Рукавицына. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. с. 70–8.
26. *Менделеева Л.П., Вотякова О.М., Покровская О.С. и др.* Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению множественной миеломы. Гематология и трансфузиология. 2014;59(приложение 3):1–37.
27. *Lin P.* Плазмоклеточная миелома. Прогресс в лечении множественной миеломы. Best Clin Pract, русское издание. 2009;2:11–6.
28. *Вотякова О.М., Любимова Н.В., Турко Т.А. и др.* Клиническое значение исследования свободных легких цепей иммуноглобулинов при множественной миеломе. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2010;5(4):16–20.

Д.А. Буров², О.А. Безнос¹, И.К. Воротников¹, В.Ю. Сельчук^{1,2}, Н.Н. Тупицын¹

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ НА КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение “РОНЦ им. Н.Н. Блохина” Минздрава России

² Кафедра онкологии Московского Государственного Медико-стоматологического Университета им. А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Резюме

Исследование экспрессии молекул гистосовместимости I и II классов на клетках рака молочной железы проведено у 58 больных. Установлены критерии оценки HLA I и HLA DR⁺ иммунофенотипов. Экспрессия HLA DR на опухолевых клетках характерна для ранних стадий (I, IIa) рака молочной железы и не наблюдается при IIb–IIIa стадиях ($p=0,031$). При нарастании степени злокачественности рака молочной железы от I к III доля HLA-DR⁻ случаев увеличивается от 25 % до 100 % ($p=0,005$). Экспрессия молекул HLA-DR на клетках рака молочной железы не характерна для опухолей с высоким пролиферативным индексом ($p=0,001$). Экспрессия HLA-DR на клетках рака молочной железы взаимосвязана со статусом рецепторов прогестерона: частота HLA-DR⁻ случаев достоверно выше в рецептор-негативных случаях, $p=0,043$.

Ключевые слова: рак молочной железы, HLA-I, HLA-DR

D.A. Burov², O.A. Beznos¹, I.K. Vorotnikov¹, V.Y. Selchuk^{1,2}, N.N. Tupitsyn¹

CLINICAL SIGNIFICANCE OF HISTOCOMPATIBILITY MOLECULES EXPRESSION IN BREAST CANCER

¹Federal State Budgetary Institute «N.N. Blokhin Russian State Cancer Research Center», Ministry of health of Russian Federation, Moscow

²A.I. Evdokimov Moscow State Medico-stomatological University, Ministry of health of Russian Federation, Moscow

Summary

Expression of HLA-I and HLA-DR molecules was studied in 58 breast cancer patients by flow cytometry. Criteria for evaluation of HLA-I and HLA-DR-positive immunophenotypes are established. Expression of HLA-DR was noted in stages I–IIa, but not in stages IIb–IIIa ($p = 0,031$). Average size of tumor in HLA-DR⁺ cases was higher than in HLA-DR⁻ ones (3,1 vs 2,4 sm, $p=0,037$). Proportion of HLA-DR⁻ cases arises from 25 % to 100 % in malignancy degree rising from I to III ($p=0,005$). HLA-DR⁺ phenotype is not characteristic for tumors with high proliferation index ($p=0,001$). Mean Ki-67⁺ cell percentage was significantly higher in HLA-DR⁻ tumors (26,6 % vs 12,5 %, $p=0,000$). HLA-DR-expression is related to progesterone-receptor status, HLA-DR⁻ cases being much frequently expressed in receptor-negative cases ($p=0,043$).

Key words: breast cancer, HLA class I, HLA-DR

РМЖ – рак молочной железы

ТИЛ – тумор-инфильтрирующие лимфоциты

Введение

В России рак молочной железы занимает 1 место в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований у женщин – 20,7 %. В период 1991–2012 гг. число заболевших увеличилось с 31 900 до 59 500 в год. Смертность женщин от рака молочной железы в России в 2012 году достигла 23 200 случаев. В то же время по мере улучшения ранней диагностики растет доля ранних форм заболевания. В 2012 году среди впервые выявленно-го рака молочной железы 64,5 % составили пациентки с I–II стадиями.

Одной из причин отсутствия существенного улучшения результатов лечения РМЖ в последние два десятилетия является недостаток знаний фундаментальных основ прогрессии этого варианта опухоли и причин ареактивности иммунной системы в отношении раковых клеток. Типичным примером мембранных рецепторов опухолевых клеток, опосредующих взаимодействие с иммунной системой и претерпевающих существенные изменения в ходе прогрессии рака молочной железы, являются молекулы гистосовместимости I и II классов [1; 2].

Функция этих молекул МНС заключается в связывании пептидных фрагментов внутриклеточных белков, их транспорте на мембрану клетки, где комплекс МНС-пептид распознается Т-киллерами или Т-хелперами [3].

Для реализации цитотоксического действия Т-киллеров в отношении опухолевых клеток необходимо распознавание армированным CD8⁺ Т-лимфоцитом комплекса опухолеспецифического пептида с молекулами HLA-I на мембране клетки рака молочной железы. Только в этом случае возможно осуществление киллерного действия Т-лимфоцита [4]. Универсальным механизмом ускользания рака молочной железы из-под контроля Т-клеточного иммунитета является антигенное упрощение опухоли, заключающееся в утрате экспрессии молекул HLA на мембране раковых клеток по мере их прогрессии [5; 6].

Клиническое значение утраты экспрессии молекул HLA-I на клетках рака молочной железы, их связь с распространенностью опухолевого процесса (стадией, наличием метастазов в регионарные лимфатические узлы) и прогнозом на различных стадиях заболевания недостаточно ясны [7–9].

Молекулы HLA II класса являются примитивными рецепторами для пептидных фрагментов экзогенных антигенов, поступающих в клетку путем фагоцитоза или пиноцитоза, которые в комплексе с молекулами HLA-II транспортируются из цитоплазмы на мембрану клетки для распознавания Т-хелперами (CD4) лимфоцитами. На нормальном покоящемся эпителии молочной железы экспрессия HLA-DR отсутствует. Антиген появляется на эпителии в поздние сроки беременности, а также при лактации [10].

Нет единства мнений относительно молекул HLA-II на клетках рака молочной железы: одни авторы считают проявлением опухолевой прогрессии наличие этих молекул, другие – их отсутствие [11]. При раке молочной железы отмечается значительная вариабельность экспрессии молекул HLA-II, причем лишь в небольшом (7–12 %) проценте случаев присутствует выраженная пропорция позитивных клеток. В большинстве (60 %) случаев наблюдается отсутствие экспрессии HLA II на клетках рака молочной железы [12].

В последние годы отмечено повышение научного интереса к анализу мембранных молекул гистосовместимости клеток рака молочной железы. Это об-

условлено более детальным пониманием дифференцировки опухолей протокового и долькового происхождения (Turashvili G., 2005), роли молекул HLA в индукции ответа Т-хелперных и Т-киллерных клеток (Oldford S. et al., 2006). Более того, появились публикации (Leth-Larsen R. et al., 2009) относительно роли молекул HLA в метастазировании рака молочной железы.

В РОНЦ имени Н.Н. Блохина накоплен большой материал, указывающий на связь экспрессии этих молекул с уровнями Т-клеточной инфильтрации опухоли, что находит отражение в прогнозе ранних стадий рака молочной железы (Артамонова Е.В., 2003). Однако точного соотношения Т-хелперного звена с экспрессией HLA-DR на раковых клетках равно как и уровней цитотоксических (CD8) Т-лимфоцитов с экспрессией мономорфных детерминант HLA-I не проводилось.

Современные возможности проточно-цитометрического анализа опухолевой ткани, количественной оценки экспрессии молекул HLA на ТИЛ и раковых клетках позволяют точно установить ассоциации активации Т-лимфоцитов с молекулами гистосовместимости.

Изучение молекул главного комплекса гистосовместимости на клетках рака молочной железы с позиций дальнейшего понимания взаимодействия опухоли и иммунной системы и улучшения на этой основе прогноза заболевания является актуальной задачей современной онкологии.

Целью настоящей работы является оценка клинического значения экспрессии молекул гистосовместимости на опухолевых клетках при раке молочной железы.

Задачи:

1. Оценить частоту экспрессии молекул гистосовместимости I и II классов при раке молочной железы различных стадий.
2. Проанализировать взаимосвязи экспрессии молекул HLA с морфологическими особенностями рака молочной железы.
3. Изучить инфильтрацию рака молочной железы субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов, их активацию в зависимости от наличия молекул HLA на опухолевых клетках.
4. Оценить особенности распространенности процесса в зависимости от экспрессии молекул гистосовместимости на клетках рака молочной железы.
5. Проанализировать взаимосвязь экспрессии молекул HLA опухолевыми клетками с клиническими и морфологическими факторами прогноза рака молочной железы.

Материалы и методы

Материалом для настоящего исследования послужили данные клинического, морфологического и проточно-цитометрического обследования 58 больных раком молочной железы, получавших лечение в отделении опухолей молочных желез ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2009 по 2013 годы.

Критерием отбора больных служил клинически, рентгенологически (маммографически) и морфологически верифицированный диагноз “рак молочной железы”.

Возраст больных находился в пределах 26–77 лет, медиана 53 года. Распределение больных по стадиям представлено в табл. 1.

Таблица 1

Распределение больных по стадиям опухолевого процесса.

| Стадия | Количество | Частота (%) |
|---------------------|------------|-------------|
| I (T1N0M0) | 14 | 24% |
| IIa (T1N1M0,T2N0M0) | 25 | 44% |
| IIб (T2N1M0,T3N0M0) | 10 | 18% |
| IIIa (T2N2M0) | 7 | 12% |
| IIIб (T4N0M0) | 2 | 4% |

В изучаемой группе больных преобладал инфильтрирующий протоковый рак (ИПР) – 42 случая (72%). Значительно реже была выявлена инфильтрирующая дольковая аденокарцинома (ИДР) – 8 случаев (14%). В 2 установлены редкие формы заболевания, в 6 – карцинома *in situ*.

При гистологическом исследовании метастазов в регионарных лимфатических узлах не обнаружено (N0) у 35 (60,3%) больных, метастазы в лимфатические узлы (N+) идентифицированы в 39,7% случаев (N1 – 20 больных; N2 – 3 больных).

Лечение у всех пациенток начиналось с хирургического вмешательства различного объема: радикальная резекция молочной железы была произведена в 12 случаях (21%), радикальная мастэктомия с сохранением грудных мышц была выполнена 46 больной (79%).

При оценке рецепторного статуса в соответствии с классификацией определения подтипов рака молочной железы (St. Gallen, 2011) люминальный А

25,9%, люминальный В (72,4%), 1,7% – базально подобный (тройной негативный) рак.

Основными реактивами, использовавшимися в проводимых исследованиях, являются отечественные и зарубежные моноклональные антитела (МКА), представленные в табл. 2.

Таблица 2

Моноклональные антитела, использованные в работе

| № | Название МКА |
|---|---|
| <i>Антигены опухолевых клеток</i> | |
| 1 | EpCam (CD326) Эпителиальный мембранный антиген |
| 2 | HLA-I Молекулы гистосовместимости I класса |
| 3 | HLA-II (HLA-DR) Молекулы гистосовместимости II класса |
| <i>Антигены иммунокомпетентных клеток</i> | |
| 4 | CD45 общелейкоцитарный антиген |
| 5 | CD3 Т - клетки |
| 6 | CD8 Т-киллеры |
| 7 | CD4 Т-хелперы |

Использованы прямые конъюгаты представленных антител с флуорохромами – FITC, PE, PE-Cy5, ECD – производства фирмы *Becton Dickinson* (США) или *Beckman Coulter* (США). Использован также ядерный краситель Syto-16.

Определение экспрессии молекул HLA на опухолевых клетках (EpCam+) методом четырех-цветной проточной цитометрии на цитометре Epics-XL-MCL. Окраску проводили методом прямой иммунофлуоресценции с использованием антител, меченых флуорохромами. Количество иммунологически изучаемых проб составляло 5:

- 1 проба: Syto16_FITC/CD326_PE/CD45_ECD/CD3_PC-5
- 2 проба: HLA-DR_FITC/CD326_PE/CD45_ECD/CD3_PC-5
- 3 проба: HLA-I_FITC/CD326_PE/CD45_ECD/CD3_PC-5
- 4 проба: HLA-DR_FITC/CD8_PE/CD45_ECD/CD3_PC-5
- 5 проба: CD4_FITC/HLA-DR_PE/CD45_ECD/CD3_PC-5

В отдельных случаях изучены также активационные антигены CD25.

Анализ результатов проводили с использованием программы WinMDI или FCS, версия 3.

Нами оценыены следующие иммунологические показатели интратуморальных лимфоцитов:

- Общий уровень лимфоидной инфильтрации – количество CD45⁺ лимфоцитов по отношению к числу ядросодержащих клеток (Syto16⁺).
- Процент зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) среди лимфоцитов (CD45⁺).
- Процент зрелых CD4⁺CD3⁺ Т-лимфоцитов.
- Процент зрелых Т-цитотоксических лимфоцитов CD3⁺CD8⁺
- Соотношение CD4/CD8
- Процент активированных CD4⁺HLA-DR⁺ клеток
- Процент активированных CD8⁺HLA-DR⁺ клеток
- Процент эпителиальных клеток EpCam⁺ экспрессирующих молекулы HLA-I и HLA-DR

Данные историй болезни и всех исследований были занесены в специально созданную базу данных. Критериями учета признаков являлись их наличие и степень выраженности. Вычисление и сравнение достоверности различий средних величин (с использованием критерия Стьюдента, различий по таблицам сопряженности признаков с использованием критерия Хи-квадрат, а также коэффициента корреляции Пирсона) производилось с помощью пакета программ SPSS версия 17. Достоверными считались различия с вероятностью не менее 95% ($p < 0.05$).

Результаты и обсуждение

Экспрессия молекул HLA-I и HLA-DR на клетках рака молочной железы.

Экспрессию молекул HLA-I класса оценили у 37 больных раком молочной железы. Средние уровни экспрессии антигена составили $65,7 \pm 4,9\%$, диапазон 4,1–100%.

Экспрессия молекул HLA-DR изучена методом проточной цитофлуориметрии у 57 больных раком молочной железы. Средние уровни экспрессии HLA-DR составили $39,6 \pm 4,0\%$ (диапазон от 0,6% до 100,0%).

Частота антиген-положительных случаев рака молочной железы по экспрессии антигенов HLA-I и HLA-DR является очень высокой – 91% и 66% соответственно (при пороговом уровне 20% антиген-позитивных клеток). Это значительно выше, чем частота соответствующих антиген-позитивных случаев, выявляемых иммуногистохимически в оценке люминисцентным методом на криостатных срезах. Так, по данным наиболее обширного исследования (Е.В. Артамонова, 2003) частота HLA-I-положительного рака молочной железы составила 56,2%, а HLA-DR-позитивного – 25%. Разница в частоте, определяемой проточно-цитометрически, и в люминисцентной микроскопии

обусловлена тем, что проточно-цитометрически выявляется довольно слабая экспрессия, которую невозможно определить люминесцентной микроскопией.

Наши данные указывают на то, что в популяции опухолевых клеток рака молочной железы, как правило, отсутствуют 2 четко разграничимые фракции опухолевых клеток – положительная и отрицательная. Обычно, сигнал непрерывно нарастает от отрицательных к положительным клеткам. Поэтому важным явилось определение уровня экспрессии антигена, выше которого клетки можно считать антиген-позитивными, и процента антиген-позитивных клеток, выше которого данный случай можно считать антиген-позитивным. Молекулы HLA-I класса представлены на всех клетках человека за исключением эритроцитов. Поэтому определение порогового уровня экспрессии молекул HLA-I на опухолевых клетках мы проводили на основании сравнительной оценки с экспрессией антигена на лейкоцитах. Молекулы HLA-DR представлены не на всех клетках человека. Для определения порогового уровня экспрессии этих молекул использовали в качестве положительного контроля В-лимфоциты. На рис. 1 представлена схема определения порогового уровня HLA-DR, значения выше которого считали позитивными. Выделяли гейт

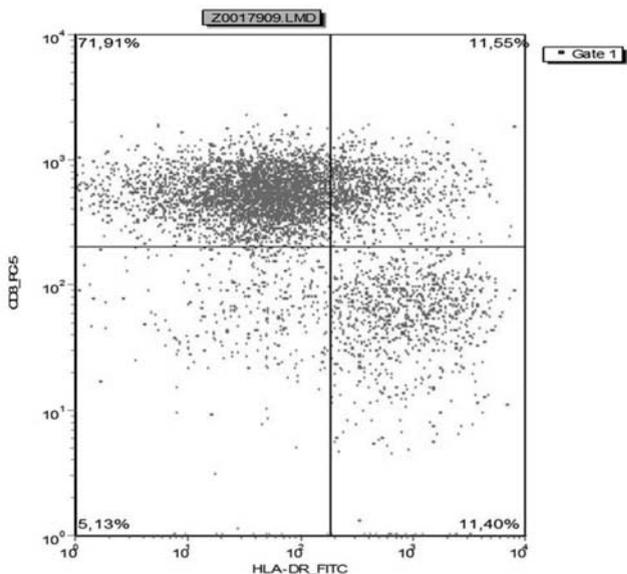


Рисунок 1. Схема определения порогового уровня HLA-DR

лимфоцитов на основании экспрессии CD45⁺ и с низкими характеристиками рассеяния света лазерного луча. Анализировали экспрессию HLA-DR в гейте лимфоцитов. По оси абсцисс устанавливали интенсивность сигнала HLA-DR, по оси ординат – экспрессию маркера CD3. Таким образом, становилось возможным, раздельно оценить экспрессию HLA-DR на В-клетках (или, точнее, на не-Т-клетках, отрицательных в реакции на CD3) и на CD3-позитивных Т-лимфоцитах. За пороговый уровень экспрессии принимали наименьшую величину сигнала позитивных В-лимфоцитов. Этот же уровень считали в дальнейшем пороговым для опухолевых клеток.

Проточно-цитометрический метод в силу своей высокой чувствительности открывает значительно большие возможности, чем метод люминисцентной микроскопии. На примере HLA-DR видно, что частота позитивных случаев совпадает с таковой для люминисцентной микроскопии при пороговом уровне 70%, табл. 3.

Таблица 3

Частота HLA-DR-положительных случаев в зависимости от порогового процентного уровня антиген-позитивных клеток

| Процент HLA-DR⁺ опухолевых клеток, выше которого случаи относили к позитивным | Число (%) отрицательных | Число (%) позитивных |
|---|--------------------------------|-----------------------------|
| 20% | 19 (33,3) | 38 (66,7) |
| 30% | 27 (47,4) | 30 (52,6) |
| 40% | 32 (56,1) | 25 (43,9) |
| 50% | 38 (66,7) | 19 (33,3) |
| 60% | 41 (71,9) | 16 (28,1) |
| 70% | 45 (78,1) | 12 (21,1) |
| 80% | 48 (84,2) | 9 (15,8) |

При анализе клинического значения и иммунологических взаимосвязей рассматривали не только 70% уровень HLA- антиген-положительных клеток, но и более низкие уровни.

Клинические особенности HLA-I-позитивной группы больных раком молочной железы.

Не установлено взаимосвязи экспрессии молекул HLA с возрастом больных, со стадией, размером опухоли и наличием метастазов регионарные лимфатические узлы ($p = 0,47; 0,68; 0,38; 0,4$ соответственно).

При анализе экспрессии молекул гистосовместимости I класса (пороговый уровень 70%) в зависимости от гистологического варианта рака молочной железы нами не установлено достоверной связи: при инфильтративном дольковом и инфильтративном протоковом раке отрицательные по HLA-I случаи выявлялись с одинаковой частотой. Разделение больных на подтипы (люминальный A, люминальный B) в зависимости от экспрессии HLA-I на опухолевых клетках показало отсутствие связи с экспрессией молекул HLA-I, $p = 0,4$.

Анализ взаимосвязи экспрессии молекул HLA-I в зависимости от степени злокачественности опухоли проведен нами при всех уровнях экспрессии, расцениваемых как позитивные (от 20% до 80%). Только при уровне 40% взаимосвязь была достоверной ($p = 0,044$).

Пролиферативный индекс Ki-67. При оценке взаимосвязи двух качественных показателей (индекс Ki-67 и экспрессия молекул HLA-I класса) по таблицам сопряженности признаков достоверности не получено. Вместе с тем, при низком пролиферативном индексе частота утраты молекул HLA-I на опухолевых клетках была минимальной, что особенно отчетливо проявляется при пороговом уровне HLA-I 70%. В этом случае взаимосвязь близка к достоверной ($p = 0,086$). Аналогичным образом, сравнили средние уровни Ki-67-позитивных клеток в зависимости от HLA-I-позитивности. Ни при одном из уровней отнесения опухоли к HLA-I-негативной процент Ki-67-позитивных клеток в сравниваемых группах не различался.

Экспрессия рецепторов эстрогенов. При пороговом уровне 40% для HLA-I наименьшая частота HLA-I-негативных случаев отмечена в группе пациенток, позитивных по рецепторам эстрогенов (8,3%). Это в 4,5 раза ниже, чем в рецептор-отрицательной группе (38,5%). Признаки достоверно взаимосвязаны, $p = 0,039$. При данном пороговом уровне различия в среднем балле рецепторов эстрогенов между HLA-I-негативными и HLA-I-позитивными опухолями были близки к достоверным: $2,86 \pm 1,3$ и $4,97 \pm 0,5$, соответственно, $p = 0,09$.

Экспрессия рецепторов прогестерона. При том же пороговом уровне HLA-I оценили взаимосвязь рецепторов прогестерона с позитивностью по HLA-I, взаимосвязь не была достоверной, $p = 0,34$.

Взаимосвязи с экспрессией Her2/Neu также не обнаружено, $p = 0,94$

Таким образом, существуют определенные клиничко-патоморфологические связи с экспрессией молекул гистосовместимости I класса на клетках рака молочной железы. Эти взаимосвязи касаются степени злокачественности опухоли, пролиферативного индекса, а также статуса по рецепторам эстроге-

нов. Общая тенденция такова – при нарастании степени злокачественности, пролиферативного индекса частота HLA-I-негативных опухолей возрастает. Доля этих опухолей в случаях негативных по статусу эстрогеновых рецепторов выше, чем в рецептор-позитивных случаях.

Клинические особенности HLA-DR-позитивной группы больных раком молочной железы.

Взаимосвязи экспрессии HLA-DR с возрастом больных не установлено ($p = 0,73$).

Стадия заболевания. Взаимосвязь экспрессии HLA-DR со стадией заболевания оценена при различных пороговых значениях антигена. При уровне 70% связь была достоверной, $p = 0,031$: экспрессия молекул HLA-DR наиболее характерна для стадий I–IIa и не наблюдалась при стадиях IIb и IIIa.

Взаимосвязи экспрессии HLA-DR с размером опухоли (индекс T) не отмечено, $p = 0,68$. Вместе с тем, средние размеры опухолевых узлов были достоверно большими при HLA-DR-позитивных опухолях в сравнении с HLA-DR-негативными: $3,05 \pm 0,25$ см ($n = 38$) и $2,37 \pm 0,19$ см ($n = 19$), $p = 0,037$ (пороговый уровень – 20%).

Связи поражения регионарных лимфатических узлов с экспрессией HLA-DR на опухолевых клетках не установлено, $p = 0,98$.

При пороговых уровнях HLA-I-позитивных клеток 70% и 80% взаимосвязь со степенью злокачественности опухоли была достоверной ($p = 0,005$ и $p = 0,049$ соответственно): по мере нарастания степени злокачественности от I до III увеличивается доля HLA-DR-негативных случаев (до 100%) и снижается доля HLA-DR-позитивных случаев (до 0%). Это очень интересное наблюдение, которое свидетельствует о том, что при нарастании степени злокачественности экспрессия HLA-DR утрачивается.

В целом достоверной взаимосвязи экспрессий HLA-DR на опухолевых клетках с гистологическим вариантом опухоли не отмечено. Взаимосвязи с подтипами люминального рака A и B также не установлено, $p = 0,58$.

Имела место достоверная взаимосвязь HLA-DR-позитивности опухоли с пролиферативным индексом Ki-67. При высоком пролиферативном индексе лишь в 6,3% случаев имела место HLA-DR-позитивность (пороговый уровень 70%), в то время как при низком пролиферативном индексе соответствующая частота составила 50%, $p = 0,001$. Сравнение средних процентов Ki-67-позитивных клеток выявило достоверные различия между HLA-DR-позитивными и HLA-DR-негативными опухолями: $12,5 \pm 1,8\%$ ($n = 8$) и $26,6 \pm 2,5\%$ ($n = 36$), соответственно, $p = 0,000$. Подобные закономерности имели место также при пороговых уровнях 60% ($p = 0,019$) и 80% ($p = 0,02$). Следовательно, уровень пролиферативной активности HLA-DR-позитивных опухолей достоверно ниже, чем уровень HLA-DR-негативных опухолей.

Взаимосвязи с экспрессией рецепторов эстрогенов не отмечено, $p=0,7$.

При 70%-ном уровне позитивности взаимосвязь экспрессии HLA-DR со статусом рецепторов прогестерона носит достоверный характер. В рецептор-отрицательной группе частота случаев, отрицательных по HLA-DR значительно выше, чем в рецептор-положительных случаях (92% и 70%), $p = 0,043$.

Взаимосвязь экспрессии Her2/Neu с наличием HLA-DR на опухолевых клетках близка к достоверной ($p = 0,05$) и заключаются в том, что экспрессия Her2/Neu (2+) в HLA-DR-позитивной группе встречается существенно реже, чем в HLA-DR-отрицательной группе (10,5% и 31,6% соответственно).

Таким образом, взаимосвязи с экспрессией молекул HLA-DR касаются стадии заболевания, размера опухоли, степени злокачественности, уровня пролиферативной активности, статуса рецепторов прогестерона.

Обычно утрату экспрессии молекул HLA-I класса связывают с опухолевой прогрессией, степенью анаплазии, большей агрессивностью в силу способности «уходить» от иммунной защиты организма из-за неспособности презентировать опухолеассоциированные антигены (пептиды) Т-киллеров. Наши результаты во многом согласуются с этой концепцией. Действительно, при раке молочной железы с высоким пролиферативным индексом отсутствие молекул HLA-I наблюдалось достоверно чаще, чем при опухолях с низким пролиферативным индексом. Определённая связь отмечена также со степенью злокачественности опухоли.

Представленные данные свидетельствуют об особых свойствах опухолей молочных желез, выявленными на основании утраты экспрессии молекул гистосовместимости I и II классов.

Взаимосвязь экспрессии молекул **HLA** на клетках рака молочной железы с субпопуляционным составом интратуморальных лимфоцитов.

Сравнили среднее содержание интратуморальных лимфоцитов в HLA-I-антиген-позитивной и негативной группах для каждого порогового уровня экспрессии молекул HLA-I, выше которого опухоль расценивалась как антиген-позитивная (в табл. 3 приведены только достоверные и близкие к достоверным различия).

При анализе взаимосвязи экспрессии молекул HLA-I с содержанием интратуморальных лимфоцитов различных субпопуляций выявляется совершенно четкая картина. Экспрессия HLA-I положительно влияет на уровень инфильтрации опухоли лимфоцитами (процент CD45⁺ лимфоцитов среди всех ядросодержащих клеток опухолевой ткани), зрелыми Т-клетками (процент CD3 в пределах лимфоцитов CD45⁺⁺), Т-хелперами (CD4⁺ в пределах зрелых CD3⁺ Т-лимфоцитов). На определенных этапах отмечается взаимосвязь с активацией Т-клеток (CD3⁺HLA-DR⁺) и обратная связь с уровнями активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺HLA-DR⁺).

Каждый из этих параметров нуждается в серьезном рассмотрении и обсуждении.

1. Уровень лимфоцитарной инфильтрации опухоли. Для этой цели использован показатель количества CD45⁺⁺ клеток с низкими характеристиками бокового рассеяния света лазерного луча SSC^{low}, то есть лимфоцитов в пределах всех ядросодержащих клеток опухолевой ткани (использован ядерный краситель Syto16). Уровни интратуморальных лимфоцитов были выше во всех случаях в HLA-I-позитивной группе больных (вне зависимости от порогового уровня HLA-I-позитивных клеток, используемого для отнесения к HLA-I-позитивной группе). Наибольшие различия получены между группами с наличием более 80% HLA-I⁺ опухолевых клеток и с наличием меньшего количества этих клеток. Иными словами, рак молочной железы, состоящий более чем на 80% из HLA-I-позитивных клеток вдвое более сильно инфильтрирован лимфоцитами, чем группа опухолей с меньшим количеством HLA-I-позитивных клеток (6,5% и 3,1% лимфоцитов в опухолевой ткани соответственно). Подобная тенденция сохраняется и при других пороговых уровнях экспрессии HLA-I на опухоли, используемых для отнесения к HLA-I-позитивной группе. То есть уровни инфильтрации опухоли лимфоцитами (Т-клетки, В-клетки, НК-клетки) напрямую зависят от экспрессии на опухоли молекул HLA-I класса.
2. Из числа проанализированных субпопуляций интратуморальных лимфоцитов наибольшую связь с экспрессией молекул HLA-I на опухолевых клетках имели зрелые Т-клетки (CD3), пропорция которых в пределах лимфоцитов (CD45⁺⁺) была выше в группе HLA-I-позитивных опухолей в сравнении с HLA-I-негативными опухолями. Наиболее достоверные данные получены при уровнях HLA-I-позитивных клеток 20%, 30%, 40% среди всей популяции опухолевых клеток (ErCAM, CD326⁺).
3. В пределах зрелых Т-клеток (CD3⁺) популяция Т-хелперов (CD4⁺) напрямую зависит от уровней экспрессии HLA-I в опухолевой ткани. Достоверно более высокие уровни CD4⁺CD3⁺ лимфоцитов наблюдаются при уровне HLA-I выше 20%, то есть при достаточно высокой пропорции HLA-I-негативных клеток в опухолевой ткани.
4. Еще одним важным признаком роли экспрессии в HLA-I молекул на клетках рака молочной железы является нарастание пропорции активированных зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺) HLA-I-позитивных опухолях в сравнении с HLA-I-негативным раком молочной железы. При наличии 60% и более HLA-I-позитивных опухолевых клеток содержание активированных Т-лимфоцитов вдвое выше, чем в

опухолях, содержащих меньшую пропорцию HLA-I-позитивных клеток ($27,3 \pm 6,1\%$ и $13,0 \pm 3,4$ соответственно, $p = 0,043$).

Таким образом, HLA-I-позитивные опухоли характеризуются более высокими уровнями лимфоцитарной инфильтрации за счет зрелых Т-хелперных клеток и активированных CD3⁺ зрелых Т-лимфоцитов.

Оценили взаимосвязь экспрессии молекул HLA-DR со степенью инфильтрации опухоли субпопуляциями Т-лимфоцитов. Изучены те же самые, что и в случае HLA-I субпопуляции Т-лимфоцитов (достоверные и близкие к достоверным различия представлены в табл. 4).

Таблица 4

Сравнение средних уровней интратуморальных Т-клеток и их субпопуляций в зависимости от экспрессии HLA-I на опухолевых клетках

| Уровень HLA-DR | Субпопуляция Т-клеток | Группа по HLA-I | | P |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
| | | HLA-I ⁺ (M±m, n) | HLA-I ⁻ (M±m, n) | |
| 20% | CD3 ⁺ CD45 ⁺ | 75,3±2,2 (29) | 54,6±13,6 (3) | 0,014 |
| | CD4 ⁺ CD3 ⁺ | 49,7±2,1 (26) | 34,2±12,2 (3) | 0,043 |
| | CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ | 19,0±4,1 (27) | 48,3±3,8 (3) | 0,002 |
| 30% | CD3 ⁺ CD45 ⁺ | 75,9±2,4 (26) | 62,3±7,4 (6) | 0,033 |
| 40% | CD3 ⁺ CD45 ⁺ | 76,1±2,5 (25) | 63,7±6,4 (7) | 0,041 |
| 50% | CD3 ⁺ CD45 ⁺ | 76,8±2,99 (20) | 67,7±4,2 (12) | 0,08 |
| | CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | 27,3±6,1 (19) | 13,4±3,6 (12) | 0,06 |
| 60% | CD3 ⁺ CD45 ⁺ | 76,4±3,1 (19) | 68,9±4,0 (13) | 0,15 |
| | CD4 ⁺ CD3 ⁺ | 51,8±3,2 (16) | 43,6±3,2 (13) | 0,086 |
| | CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | 28,3±6,3 (18) | 13,0±3,4 (13) | 0,043 |
| 70% | CD3 ⁺ CD45 ⁺ | 77,1±3,3 (17) | 69,2±3,7 (15) | 0,12 |
| 80% | CD45 ⁺ в Syto | 6,5±1,99 (15) | 3,1±0,7 (22) | 0,07 |

При анализе субпопуляций интратуморальных Т-лимфоцитов в группах рака молочной железы, различающихся по экспрессии HLA-DR, достоверные данные были получены, в основном, для активированных клеток. Так, процентное содержание активированных зрелых Т-клеток (CD3⁺HLA-DR⁺) при HLA-DR⁺ фенотипе рака молочной железы было выше, чем при HLA-DR⁻ негативном, наиболее значимые различия получены при пороговом уровне HLA-

DR, приймаємо за позитивний 20%, 30% і 50%. Причому при рівні 30% різниці були достовірними ($p = 0,024$). Рівні активізованих Т-хелперів ($CD4^+HLA-DR^+$) також були вищими в $HLA-DR^+$ групі раку молочної залози.

Загальне вміст інтрамуральних Т-лімфоцитів ($CD45^+CD3^+$) також було вище при $HLA-DR^+$ іммунофенотипі, причому при використанні порогового рівня 70% різниці достовірні (табл. 5).

Таблиця 5

Сравнение средних уровней интрамуральных Т-лимфоцитов и их субпопуляций в зависимости от экспрессии молекул HLA-DR на опухолевых клетках

| Уровень HLA-DR | Субпопуляция Т-клеток | Группа по HLA-DR | | P |
|----------------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|
| | | HLA-DR ⁺ (M±m, n) | HLA-DR ⁻ (M±m, n) | |
| 20% | CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | 24,8±4,8 (25) | 11,4±4,8 (7) | 0,06 |
| 30% | CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | 27,2±5,5 (21) | 11,6±3,6 (11) | 0,024 |
| 40% | CD45 ⁺ CD4 ⁺ | 42,3±2,3 (15) | 48,6±2,2 (17) | 0,059 |
| | CD4 ⁺ CD25 ⁺ | 10,9±2,3 (7) | 5,97±1,3 (9) | 0,069 |
| 50% | CD3 ⁺ CD45 ⁺ | 82,3±2,3 (17) | 75,3±2,8 (31) | 0,057 |
| | CD45 ⁺ CD4 ⁺ | 41,2±2,5 (11) | 48,0±2,0 (21) | 0,046 |
| | CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | 16,6±4,1 (21) | 31,9±8,0 (11) | 0,069 |
| 60% | CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ | 23,9±4,3 (15) | 15,3±2,1 (32) | 0,055 |
| | CD3 ⁺ CD25 ⁺ | 13,3±2,7 (6) | 7,5±1,5 (10) | 0,054 |
| | CD4 ⁺ CD25 ⁺ | 11,6±2,6 (6) | 6,0±1,1 (10) | 0,037 |
| 70% | CD45 ⁺ Syto ⁺ | 1,9±0,8 (8) | 5,0±1,1 (30) | 0,035 |
| | CD45 ⁺ CD3 ⁺ | 83,8±2,9 (10) | 76,2±2,4 (38) | 0,05 |
| | CD3 ⁺ CD25 ⁺ | 14,7±3,7 (4) | 7,99±1,3 (12) | 0,048 |
| | CD4 ⁺ CD25 ⁺ | 13,7±3,7 (4) | 6,2±0,9 (12) | 0,01 |
| 80% | CD3 ⁺ CD25 ⁺ | 15,2±5,2 (3) | 8,39±1,3 (13) | 0,07 |
| | CD4 ⁺ CD25 ⁺ | 13,97±4,97 (3) | 6,75±1,0 (13) | 0,031 |

Рівні активізованих Т-кліток ($CD3^+CD25^+$) і активізованих Т-хелперних кліток ($CD4^+CD25^+$) також були вищими при наявності $HLA-DR$ на опухолевых клетках.

Вместе с тем, общий уровень инфильтрации опухоли CD4⁺ клетками был несколько более высоким при HLA-DR-негативном иммунофенотипе (41 и 48%). При пороговом уровне HLA-DR⁺ опухолевых клеток в 50% различия между группами достоверны.

Следовательно, HLA-DR-позитивный иммунофенотип сопровождается более выраженной Т-клеточной инфильтрацией (CD45⁺CD3⁺), инфильтрацией активированными Т-клетками (CD3⁺ HLA-DR⁺ и CD3⁺CD25⁺), а также активированными Т-хелперными клетками (CD4⁺HLA-DR⁺ и CD4⁺CD25⁺).

Полученные нами данные свидетельствуют о важной роли экспрессии молекул гистосовместимости HLA I и II классов в реализации местных реакций противоопухолевого иммунитета – уровнях и активации интратуморальных лимфоцитов при раке молочной железы. Следовательно, клинические исследования, направленные на индукцию экспрессии молекул HLA опухолевыми клетками при раке молочной железы, можно считать вполне оправданными.

Взаимосвязь субпопуляций интратуморальных лимфоцитов с клиническими и патоморфологическими особенностями рака молочной железы.

У больных старшего возраста (≥ 50 лет) средние уровни CD4⁺ лимфоцитов были выше 48% и 42%, различия близки к достоверным ($p = 0,54$).

Среднее содержание интратуморальных Т-клеток CD4⁺CD3⁺ в опухолях более крупного размера (Т3, Т4) было достоверно более высоким, чем при опухолях меньшего размера (Т1, Т2) – 61% и 47,6% соответственно ($p = 0,041$). При сопоставлении опухолей Т1 с Т2-Т4 содержание различных субпопуляций лимфоцитов сохраняется та же тенденция, что и для сопоставлений Т1-Т2 с Т3-Т4 – более выраженная пропорция Т-хелперов CD4⁺ при более крупных опухолях (47% и 40% соответственно $p = 0,006$). При опухолях малого размера отмечается достоверно более высокий процент интратуморальных CD4⁺CD25⁺ клеток – 13,6% и 7,3% соответственно, $p = 0,038$.

Количество HLA-DR позитивных лимфоцитов при опухолях с отсутствием регионарных метастазов (N0) было более высоким в сравнении с опухолями, при которых имелись метастазы (N1-N3) – 38% и 25% соответственно, $p = 0,038$. HLA-DR лимфоциты являются достаточно широкой группой и включают В-клетки, активированные Т-клетки и активированные НК-клетки. Все субпопуляции активированных (HLA-DR-положительных) Т-лимфоцитов (CD3, CD4, CD8) при отсутствии метастазов были повышены, что и нашло отражение в достоверных различиях по HLA-DR-положительным лимфоцитам в целом.

При II и III степенях злокачественности процент опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов в опухолях был достоверно выше, чем при опухолях I степени злокачественности – 4,5% и 2% соответственно, $p = 0,041$. Пропорция зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), напротив, снижалась при нарастании степени злока-

чественности: при II, III степени злокачественности – 76,7%, при I – 89,4%, $p = 0,001$. Интересные данные получены по активированным CD3⁺HLA-DR⁺ и по CD4⁺HLA-DR⁺ клеткам: количество этих клеток при I степени злокачественности было достоверно более высоким ($p = 0,000$). Однако, учитывая тот факт, что в группе сравнения больных с опухолями I степени злокачественности было всего две пациентки, потребуется дальнейшее накопление материала для подтверждения этих данных.

При сопоставлении III степени злокачественности с I, II степенями по уровням интратуморальных лимфоцитов подтверждено, что у больных с опухолями III степени злокачественности количество CD45⁺ Syto-16⁺ клеток было достоверно более высоким – 7,7% и 3,2% соответственно, $p = 0,025$.

Содержание интратуморальных Т-клеток выше при Ia стадии рака молочной железы в сравнении со Ib – III стадиями – 84,7% и 75,7%, $p = 0,028$. Кроме того, при Ia стадии отмечены более высокие уровни активированных Т-лимфоцитов и Т-хелперов (CD3⁺ и CD4⁺) в сравнении с содержанием этих клеток при Ib – III стадиях, $p = 0,02$ и $p = 0,04$ соответственно. Те же тенденции отмечены при сопоставлении I и II–III стадий: более высокое содержание CD3⁺ лимфоцитов при I стадии и достоверно более высокое содержание CD3⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺ клеток. При сопоставлении IIb – III стадий с более ранними стадиями оказалось, что при прогрессировании заболевания достоверно повышено количество Т-хелперных лимфоцитов (CD4⁺) – 51% и 43%, $p = 0,016$. При этом количество CD25⁺ субпопуляции этих клеток при стадиях I–IIa было также высоким, $p = 0,055$. В сравнении с I, II стадиями, III стадия рака молочной железы характеризуется дальнейшим нарастанием содержания Т-хелперов (CD4⁺CD3⁺) (61% и 47%, $p = 0,01$) и CD8⁺ клеток среди лимфоцитов (50,9% и 40%, $p = 0,049$). Последнее, по-видимому, обусловлено НК-клетками, так как пропорции CD8⁺CD3⁺ клеток достоверно не увеличивается.

Количество интратуморальных Т-лимфоцитов (CD3⁺) было достоверно более высоким при опухолях с низким уровнем пролиферирующих клеток – 83% и 71%, $p = 0,019$. Аналогичным образом, содержание CD8⁺ лимфоцитов было более высоким при низком уровне Ki67 клеток – 47,4% и 39%, $p = 0,018$.

При сравнении групп опухолей, различающихся по пролиферативному индексу (пороговый уровень Ki-67 – 15%) выявились достоверные различия по CD4⁺ Т-лимфоцитам (CD3⁺) увеличенным в группе с высоким пролиферативным индексом – 45% и 49%, $p = 0,02$.

В рецептор-положительной группе (по рецепторам эстрогенов) отмечена достоверно более низкая инфильтрация опухоли лимфоцитами – 2,5% и 7,9% соответственно, $p = 0,004$. Однако, уровни Т-клеток (CD3) в рецептор-позитивной группе были более высокими, различия близки к достоверным ($p = 0,085$). В случаях положительных по экспрессии рецепторов

прогестерона наблюдалось достоверно более низкая инфильтрация опухоли лимфоцитами – 2,6% и 6,8%.

Нами установлено достоверно более высокое содержание активированных Т-клеток в Her2/Neu-отрицательных (0 баллов) случаях (28% и 11%, $p = 0,014$). Это обусловлено популяцией активированных CD4⁺ лимфоцитов, содержание которых в Her2/Neu-негативных случаях вдвое выше, чем при Her2/Neu-позитивных (21% и 12%, $p = 0,014$). В группе пациенток со статусом Her2/Neu 2–3 балла отмечено достоверно более высокое содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов (CD3⁺) в сравнении с больными с отрицательным статусом (0–1 баллов) – 50% и 39%, $p = 0,041$. Отмечено также более высокое содержание CD8⁺ лимфоцитов при отрицательном статусе по Her2/Neu (0–1 баллов) – 42% и 29%, $p = 0,014$. Последнее обусловлено, по-видимому, NK-клетками, так как достоверного повышения CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов не выявлено.

При количественной оценке содержания интратуморальных лимфоцитов в зависимости от гистологического типа рака молочной железы, при сравнении инфильтративного долькового и инфильтративного протокового рака, нами выявлены достоверные различия. При инфильтративном протоковом раке выявлены достоверно более высокие уровни инфильтрации опухоли лимфоцитами ($p = 0,04$), активированными Т-клетками ($p = 0,009$) и активированными Т-киллерами CD3⁺CD8⁺ ($p = 0,038$).

Подтипы люминального рака также достоверно различаются по уровням тумор-инфильтрующих лимфоцитов и их субпопуляциям. Так, при люминальном А раке уровни инфильтрации опухоли лимфоцитами были в 5 раз более высокими, чем при люминальном В (10,5% и 2,2%, $p = 0,026$). Вместе с тем, люминальный подтип В характеризовался достоверно более высокой инфильтрацией опухоли Т-лимфоцитами – 81% и 70%, $p = 0,016$.

Таким образом, уровни интратуморальных лимфоцитов имеют прямую взаимосвязь с клиническими, морфологическими и биологическими характеристиками опухоли. Как мы уже отмечали, уровни инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами и их субпопуляциями напрямую взаимосвязаны с экспрессией молекул HLA-I и II классов на опухолевых клетках. Экспрессия молекул HLA-I и II классов на опухолевых клетках, таким образом, находит отражение в особенностях клинического течения рака молочной железы.

Заключение

В результате проведенного исследования впервые на большом клиническом материале установлены клиничко-иммуноморфологические ассоциации в зависимости от экспрессии молекул гистосовместимости на клетках рака мо-

лочной железы. Впервые соотнесена экспрессия молекул гистосовместимости с рецепторным статусом и морфологическими особенностями опухоли. Утрата экспрессии молекул HLA-I класса на клетках рака молочной железы характеризует группу опухолей со сниженной инфильтрацией опухоли лимфоцитами (процент CD45⁺ лимфоцитов среди всех ядродержащих клеток опухолевой ткани), зрелыми Т-клетками (процент CD3 в пределах лимфоцитов CD45⁺), Т-хелперами (CD4⁺ в пределах зрелых CD3⁺ Т-лимфоцитов).

HLA-DR-позитивный иммунофенотип рака молочной железы сопровождается достоверно более выраженной Т-клеточной инфильтрацией (CD45⁺CD3⁺), инфильтрацией активированными Т-клетками (CD3⁺HLA-DR⁺ и CD3⁺CD25⁺). Наиболее редкая утрата антигена наблюдается при низком пролиферативном индексе опухоли и в случаях, положительных по экспрессии рецепторов эстрогенов. Экспрессия HLA-DR на опухолевых клетках характерна для ранних стадий (I, IIa) рака молочной железы и не наблюдается при IIб – IIIa стадиях ($p = 0,031$). При нарастании степени злокачественности рака молочной железы от I к III доля HLA-DR-негативных случаев увеличивается от 25% до 100% ($p = 0,005$). Экспрессия молекул HLA-DR на клетках рака молочной железы характерна для опухолей с низким пролиферативным индексом, и средние уровни Ki-67-позитивных клеток достоверно выше при HLA-DR-негативных опухолях в сравнении с HLA-DR-позитивными (26,6% и 12,5%, $p = 0,001$).

Экспрессия HLA-DR на клетках рака молочной железы взаимосвязана со статусом рецепторов прогестерона: частота HLA-DR-отрицательных случаев достоверно выше в рецептор-негативных случаях, $p = 0,043$.

При отсутствии метастазов рака молочной железы в регионарных лимфатических узлах (N0) отмечаются более высокие содержание активированных (HLA-DR⁺) интратуморальных Т-лимфоцитов (CD3, CD4, CD8), что отражается на более высоких уровнях HLA-DR⁺CD45⁺ лимфоцитов у больных с отсутствием метастазов (N0) в сравнении с больными, у которых метастазы обнаружены (N1 – N3).

При II и III степенях злокачественности рака молочной железы процент опухолеинфильтрирующих лимфоцитов был достоверно выше, чем при опухолях I степени злокачественности ($p = 0,041$), вместе с тем пропорция зрелых Т-лимфоцитов (CD3), а также активированных CD3⁺HLA-DR⁺ и CD4⁺HLA-DR⁺ клеток была достоверно более низкой. Содержание интратуморальных, а также активированных Т-клеток (CD3) и Т-хелперов (CD4) выше при I стадии рака молочной железы в сравнении со II–III стадиями ($p = 0,028–0,04$). При III стадии рака молочной железы повышены CD8⁺CD45⁺ лимфоциты.

Количество интратуморальных CD3⁺ Т-лимфоцитов и CD8⁺ клеток было достоверно более высоким при опухолях с низким уровнем Ki67⁺

пролиферирующих клеток. В рецептор-положительной группе (по рецепторам эстрогенов, прогестерона) отмечена достоверно более низкая инфильтрация опухоли лимфоцитами.

Впервые показано, что более высокое содержание активированных Т-клеток и активированных CD4⁺ лимфоцитов наблюдается в Her2/Neu-отрицательных (0 баллов) случаях. При отрицательном статусе по Her2/Neu (0–1 баллов) достоверно повышены CD8⁺ лимфоциты.

При инфильтративном протоковом раке в сравнении с инфильтративным дольковым раком выявлены достоверно более высокие уровни инфильтрации опухоли лимфоцитами, активированными Т-клетками и активированными Т-киллерами CD3⁺CD8⁺.

Подтипы люминального рака достоверно различаются по уровням опухолеинфильтрующих лимфоцитов. При люминальном А раке уровни инфильтрации опухоли лимфоцитами были в 5 раз более высокими, чем при люминальном В. Вместе с тем, люминальный подтип В характеризовался достоверно более высокой инфильтрацией опухоли Т-лимфоцитами – 81% и 70%, $p = 0,016$.

Литература

1. *Aptsiauri N., Cabrera T., Mendez R., Garcia—Lor A. et al.* Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression// *Adv Exp Med Biol.* — 2007. — Vol. 601. — P. 123–131.
2. *Bernard D.J., Maurizis J.C., Ruse F. et al.* Presence of HLA-D/DR antigens on the membrane of breast tumour cells// *Clin. Exp. Immunol.* — 1984. — Vol. 56. — P.215–221
3. *Algarra I., Collado A., Garrido F.* Altered MHC class I antigens in tumors// *Int J Clin Lab Res* 1997. — №27. — P. 95–102.
4. *Heron I., Hokland M., Berg K.* Enhanced expression of $\beta 2$ — microglobulin and HLA— antigens on human lymphoid cells by interferon //*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1978. —Vol.75. —P.6215–6219
5. *Goepel J.R., Rees R.C., Rogers K., Stoddard C.J. et al.* Loss of monomorphic and polymorphic HLA antigens in metastatic breast and colon carcinoma // *Br J Cancer.*—1991.—№64—P.880–3.
6. *Marincola F.M., Jaffee E.M., Hicklin D.J., Ferrone S.* Escape of human solid tumors from T- cell recognition: molecular mechanisms and functional significance // *Adv Immunol.*—2000.—Vol.74.—P.181–273.
7. *de Kruif E.M., van Nes J.G., Sajet A., Tummers Q.R. et al.* The predictive value of HLA class I tumor cell expression and presence of intratumoral Tregs

- for chemotherapy in patients with early breast cancer // *Clin Cancer Res.* — 2010. — №16. — P.1272–80.
8. *Jabrane— Ferrat N., Faille A., Loiseau P.* Effect of gamma interferon on HLA class I and II transcription and protein expression in human breast adenocarcinoma cell lines // *Int. J. Cancer.*—1990.—Vol.45, №6.—P.1169–1176.
 9. *Kaneko K., Ishigami S., Kijima Y.* Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer // *BMC cancer.* — 2011. —Vol.11. —P.454–459
 10. *Newman R.A., Ormerod R.G., Greaves M.F.* The presence of HLA-DR antigens on lactating human breast epithelium and milk fat globule membranes // *Clin. Exp. Immunol.* — 1980. —Vol.41. —P.478–486
 11. *Zuk J.A., Walker R.A.* HLA class II sublocus expression in benign and malignant breast epithelium. // *J.Pathol.* — 1988. —Vol.155. —P.301–309
 12. *Lucin K., Iternicka Z., Jonjic N.* Prognostic significance of T-cell infiltrates, expression of beta 2— microglobulin and HLA-DR antigens in breast carcinoma // *Pathol. Res. Pract.*—1994.—Vol.190.—№12.—P.1134–1140.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК