

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научно-исследовательский институт онкологии»  
Сибирского отделения  
Российской академии медицинских наук

На правах рукописи

**Кухарев Ярослав Викторович**

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ  
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО  
ЭФФЕКТА НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ У  
БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.03.03 – патологическая физиология

14.01.12 – онкология

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,  
профессор Е.Н. Кологривова

доктор биологических наук,  
профессор Н.В. Чердынцева

Томск – 2013

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность
- АЛТ – адьювантная лучевая терапия
- АХТ – адьювантная химиотерапия
- ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- ЗД – здоровые доноры
- ИПС – иммунопатологический синдром
- ИРСДФ – интенсивность реакции спонтанной кислородзависимой активности нейтрофильных фагоцитов
- ИРФР – интенсивность реакции фагоцитарного резерва
- ЛПС – липополисахарид
- МНПК – мононуклеарные клетки периферической крови
- НАХТ – неoadьювантная химиотерапия
- НСТ – нитросиний тетразолий
- РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов
- РМЖ – рак молочной железы
- СПФ – спонтанная кислородзависимая активность нейтрофильных фагоцитов
- ФГА – фитогемагглютинин
- ФР – фагоцитарный резерв
- ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы
- САФ – циклофосфан-адриамицин-5-фторурацил
- ССР – рецептор хемокина
- CD – кластер дифференцировки
- СМФ - циклофосфан-метотрексат-5-фторурацил
- FAC – 5-фторурацил-адриамицин-циклофосфан
- HER2/neu – рецептор эпителиального фактора роста человека-2
- HSP – белок теплового шока
- IFN – интерферон
- Ig – иммуноглобулин

IL – интерлейкин

MAGE – меланома-ассоциированный антиген

MHC – главный комплекс гистосовместимости

MIF – фактор, ингибирующий миграцию макрофагов

MMP – матриксная металлопротеиназа

NK – естественные клетки-киллеры

TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста  $\beta$

Th – Т-хелпер

TLR – толл-подобный рецептор (toll-like receptor)

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа

Treg – регуляторные Т-клетки

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение.....</b>	<b>6</b>
<b>Глава 1. Обзор литературы.....</b>	<b>14</b>
1.1. Особенности функционирования иммунной системы при злокачественных новообразованиях.....	14
1.1.1. Механизмы противоопухолевого иммунитета.....	14
1.1.2. Негативная роль иммунной системы при опухолевом росте.....	27
1.2. Пути преодоления несостоятельности противоопухолевого иммунитета.....	31
1.3. Иммуноопосредованные эффекты цитостатической и лучевой терапии.....	34
1.4. Роль полиморфных вариантов генов в регуляции продукции ряда цитокинов, патогенетически важных для опухолевого процесса.....	51
<b>Глава 2. Материал и методы исследования.....</b>	<b>55</b>
2.1. Организация и дизайн исследования.....	55
2.2. Клиническая характеристика обследованных пациенток и описание схем их лечения.....	55
2.3. Методы исследования.....	60
2.3.1. Определение фенотипа лимфоцитов периферической крови иммуноцитохимическим методом .....	60
2.3.2. Оценка пролиферативной активности лимфоцитов.....	61
2.3.3. Определение циркулирующих иммунных комплексов.....	62
2.3.4. Определение растворимых факторов в сыворотке крови .....	63
2.3.4.1. Определение концентрации иммуноглобулинов.....	63
2.3.4.2. Определение концентрации растворимого Fas-рецептора.....	64
2.3.4.3. Определение концентрации растворимого Fas-лиганда.....	65
2.3.5. Определение активности системы комплемента.....	65
2.3.6. Определение функциональной активности нейтрофилов периферической крови в НСТ-тесте.....	66

2.3.7. Оценка уровня секреции цитокинов в супернатантах клеточных культур мононуклеаров периферической крови .....	67
2.3.8. Метод оценки апоптоза клеток периферической крови с использованием ядерного красителя Hoechst 33342.....	68
2.3.9. Методы оценки полиморфизма генов.....	69
2.4. Статистические методы оценки полученных результатов.....	72
<b>Глава 3. Результаты исследования и их обсуждение.....</b>	<b>74</b>
3.1. Особенности функционирования иммунной системы до начала лечения у больных РМЖ с различной эффективностью НАХТ.....	74
3.2. Содержание растворимого сывороточного Fas-лиганда у больных РМЖ с различной эффективностью НАХТ .....	96
3.3. Корреляционные взаимосвязи между иммунологическими параметрами у больных РМЖ с различной эффективностью НАХТ.....	100
3.4. Выявление ассоциации эффективности НАХТ и иммунологических показателей методом логистической регрессии .....	120
3.5. Взаимосвязь эффективности НАХТ с клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса и анамнестическими данными больных РМЖ.....	122
3.6. Особенности иммунологических показателей больных РМЖ с различной степенью поражения регионарных лимфатических узлов.....	126
3.7. Особенности иммунологических показателей больных РМЖ в зависимости от наличия клинических проявлений различных иммунопатологических синдромов.....	135
3.8. Изменение параметров иммунитета после НАХТ.....	139
3.9. Взаимосвязь полиморфных вариантов генов цитокинов, патогенетически значимых для опухолевого процесса, с эффективностью НАХТ...	150
<b>Заключение.....</b>	<b>155</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>162</b>
<b>Практические рекомендации.....</b>	<b>163</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>165</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Рак молочной железы (РМЖ) стоит на первом месте по частоте встречаемости среди онкологических заболеваний у женщин в мире и в России, при этом показатели заболеваемости неуклонно растут [26, 27, 83]. РМЖ является ведущей причиной смерти от злокачественных новообразований в женской популяции, на его долю приходится более четверти смертей женщин трудоспособного возраста от рака [26, 27, 30, 184].

Основным методом лечения РМЖ является оперативное вмешательство в сочетании с лучевой терапией и лекарственным лечением (химио- и гормонотерапией). Разработаны современные схемы терапии РМЖ, обеспечивающие высокий процент послеоперационной выживаемости и более длительный безрецидивный период по сравнению с результатами только хирургического вмешательства [48].

У больных с операбельными формами РМЖ химиотерапия применяется до или после операции. Целью адьювантной (послеоперационной) химиотерапии является снижение риска отдалённого метастазирования опухоли. Установлены показания для проведения предоперационной, или неoadьювантной химиотерапии (НАХТ), которая, при условии её эффективности, обеспечивает возможность органосохранных операций, повышает абластичность хирургического вмешательства, в некоторых случаях позволяет перевести неоперабельную опухоль в операбельную и сократить объём операции, оценить чувствительность опухоли к химиотерапевтическим препаратам и выбрать адекватное лекарственное лечение в адьювантном режиме [121, 185]. Показано, что у больных с достижением полной морфологической регрессии опухоли под влиянием НАХТ существенно повышаются показатели выживаемости [79, 286].

Однако у части больных опухоль оказывается малочувствительной или нечувствительной к химиотерапии [143]. По данным Chuthapisith S. et al.,

(2006) при применении НАХТ менее 30% больных достигают полного ответа опухоли на лечение [233]. При применении одной и той же схемы лечения у одних больных опухоль регрессирует, вплоть до полного исчезновения, а у других – оказывается нечувствительной к цитостатикам, что является свидетельством роли индивидуальных свойств организма больного в реализации эффекта химиопрепаратов. Такие больные, не получая эффекта от химиотерапии, подвергаются воздействию токсичных препаратов, вызывающих побочные эффекты и снижающих качество жизни. Следует отметить, что среди стандартных критериев прогноза, включающих такие патогенетически значимые особенности злокачественного процесса, как гистотип опухоли, размер первичного очага, степень дифференцировки, метастазирование в регионарные лимфоузлы, менструальный статус пациентки, не выявлено эффективных критериев предсказания эффективности НАХТ.

В последние годы активно обсуждается вовлечение иммунологических механизмов в обеспечение эффективности химиотерапии, получены экспериментальные и клинические подтверждения этого феномена. С одной стороны, известно, что клетки иммунной системы являются важным компонентом опухолевого микроокружения, вносящего значимый вклад не только в формирование и прогрессию злокачественных опухолей, но и в обеспечение резистентности к химиотерапии. Однако с другой стороны, показана возможность изменения функционирования компонентов микроокружения с проопухолевой направленности на противоопухолевую. В качестве факторов, способных индуцировать такие изменения микроокружения, которые приводят к ингибции роста опухоли, рассматриваются химиотерапия, метромная терапия, эпигенетическая терапия и ряд других агентов [188, 243, 244]. Выявлена высокая значимость изменения экспрессии генов иммунного ответа в опухолевом микроокружении в предсказании эффективности НАХТ, что указывает на участие иммунокомпетентных клеток в реализации противоопухолевого

эффекта терапии [99, 243, 275]. Есть сведения, что чувствительность к химиотерапии регулируется макрофагами и лимфоцитами, инфильтрирующими опухоль, при этом уровень CD8<sup>+</sup> Т-клеток является предсказательным критерием ответа опухоли на цитостатический препарат [225, 244].

Получены убедительные данные о том, что иммунная система при воздействии конвенциональной противоопухолевой химиотерапии активируется посредством повышения иммуногенности опухолевых клеток, за счет появления на их мембранах неоантигенов и других сигнальных молекул в результате повреждения ДНК, ингибиции иммуносупрессорных механизмов, прямого или опосредованного стимулирующего воздействия на иммунные эффекторы [202, 243, 244, 249].

Индукцированная цитостатиками транзиторная лимфопения, по механизму обратной связи, запускает гомеостатическую пролиферацию иммунокомпетентных клеток с отменой опухоль-индуцированной анергии, связанной, в том числе, с элиминацией иммуносупрессорных Т-регуляторных клеток [180, 211]. При этом достигается повышение эффективности лечения [202, 291].

Поскольку иммунокомпетентные клетки поступают в опухолевое микроокружение из пула циркулирующих клеток крови, их конститутивные особенности (способность к пролиферации и секреции цитокинов, чувствительность к апоптозу) очевидно влияют на реализацию функциональной активности при взаимодействии с опухолевыми клетками. Наряду с этим важная роль иммунной системы в поддержании гомеостаза в условиях повреждающих воздействий различной природы, в том числе химиотерапии, предполагает возможность использования ее параметров в качестве дополнительных критериев предсказания эффективности лекарственного лечения [116].

Таким образом, не вызывает сомнений, что иммунная система активно участвует в реализации противоопухолевых эффектов на различных этапах



лечения, в том числе – при проведении НАХТ, а параметры иммунной системы могут быть использованы в качестве мониторинговых для оценки гомеостаза на уровне организма в целом в условиях опухолевого роста и в качестве дополнительных критериев для выбора адекватной тактики терапии онкологических больных.

**Цель исследования** – оценить патогенетическое значение факторов иммунной системы для противоопухолевого эффекта неoadьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы.

#### **Задачи исследования**

1. Изучить связь параметров системы иммунитета и маркёров апоптоза до начала лечения с эффективностью неoadьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы.
2. Исследовать связь клинико-морфологических показателей у больных раком молочной железы с эффективностью неoadьювантной химиотерапии.
3. Оценить особенности функционирования врождённого и адаптивного иммунитета у больных раком молочной железы до начала лечения в зависимости от наличия клинических проявлений иммунопатологических состояний и клинико-морфологических параметров злокачественного процесса.
4. Оценить изменения параметров врожденного и адаптивного иммунитета у больных раком молочной железы под влиянием неoadьювантной химиотерапии с учётом её эффективности.
5. Исследовать связь полиморфизма генов цитокинов IL-1, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  с эффективностью неoadьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы.

#### **Научная новизна**

Впервые проведено комплексное исследование сопряженности состояния иммунной системы с клиническим ответом на неoadьювантную химиотерапию больных раком молочной железы, которое позволило выявить

прогностически значимые иммунологические факторы, вносящие вклад в эффективность неoadъювантной терапии. Получены новые данные о том, что сохранность функциональных резервов иммунной системы до лечения, в частности способность к повышенной секреции провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ ), а также наличие пролиферативного потенциала Т-лимфоцитов и интенсивная продукция высокоаффинных антител (IgG) способствуют реализации противоопухолевого эффекта неoadъювантной химиотерапии. Впервые показано, что активация механизмов рецепторного пути апоптоза, проявляющаяся в повышении sFasL, CD95L+-клеток в циркуляции, и повышенная способность к секреции TNF- $\alpha$  до лечения способствуют полной регрессии опухоли в результате проведения неoadъювантной химиотерапии. Впервые выявлено, что способность мононуклеаров крови к интенсивной секреции IL-10, свидетельствующая о сохранении потенциала противовоспалительных механизмов внутрисистемной регуляции иммунных реакций, ассоциирована с высокой эффективностью неoadъювантной химиотерапии.

Получены новые данные о том, что повышение функциональной активности эффекторов врождённого иммунитета у больных раком молочной железы до начала лечения сопряжено с последующей низкой эффективностью неoadъювантной химиотерапии.

Показано, что метастатическое поражение регионарных лимфоузлов у больных раком молочной железы, негативно отражающееся на эффективности неoadъювантной химиотерапии, сопровождается признаками функционального напряжения и истощения резервов системы иммунитета и проявляется повышением количества CD16+-, CD25+ и CD95+-лимфоцитов в системной циркуляции.

Впервые установлена связь между прогрессированием опухоли после неoadъювантной химиотерапии и носительством больными раком молочной железы генотипа +3954CC гена IL1B, ассоциирующегося с низкой

экспрессией данного гена, и ассоциация полной регрессии опухоли с функционально высокоактивным аллелем 592AA гена IL10.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Уточнены патогенетические аспекты взаимоотношений иммунной системы и опухоли при раке молочной железы в условиях противоопухолевой лекарственной терапии. Исследовано изменение иммунологических параметров на фоне цитостатической терапии у больных раком молочной железы.

Выявлена зависимость клинического результата неoadьювантной химиотерапии от исходного состояния факторов иммунитета больных раком молочной железы. Полученные результаты указывают на возможность использования показателей иммунной системы в качестве дополнительных предсказательных маркёров эффективности цитостатического лечения. Выявлено прогностическое значение повышения секреции IL-10 мононуклеарами крови в отношении объективного ответа опухоли на неoadьювантную химиотерапию. Результаты исследования могут быть использованы для разработки персонифицированного подхода к планированию предоперационной химиотерапии в комплексном лечении больных раком молочной железы.

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

1. Сохранность функциональных резервов естественного и адаптивного иммунитета и повышенная готовность мононуклеаров крови к реализации процессов рецепторного апоптоза до начала лечения связаны с высокой эффективностью неoadьювантной химиотерапии.
2. При нарушении функционирования иммунной системы у больных раком молочной железы в условиях метастазирования в регионарные лимфоузлы (появление в составе циркулирующего пула большого количества НК и терминально дифференцированных Т-лимфоцитов) отмечается отсутствие объективного клинического ответа на неoadьювантную химиотерапию.

3. Высокая секреция IL-1 $\beta$  и IL-10 мононуклеарами крови и носительство функционально высокоактивного аллельного варианта IL10 -592AA гена IL-10 способствуют полной регрессии опухоли, а носительство низкоактивного аллельного варианта IL1B +3954CC гена IL-1 $\beta$  – прогрессированию опухолевого процесса в условиях неoadьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы.

**Апробация.** Основные положения работы доложены и обсуждены на II–V региональных конференциях молодых ученых имени академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2006–2010 гг.); Всероссийской научной конференции «Механизмы индивидуальной адаптации», посвященной памяти и 100-летию со дня рождения профессора В.А. Пегеля (Томск, 2006 г.); Объединённом иммунологическом форуме (Санкт-Петербург, 2008 г.); X Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2006 г.); 4-й Международной конференции, посвящённой проблемам диагностики и лечения рака молочной железы «Белые ночи Санкт-Петербурга» (2007 г.); VIII Конгрессе Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов (Москва, 2008 г.); Российской конференции с международным участием «Проблемы современной онкологии» (Барнаул, 2009 г.); VII Сибирском физиологическом съезде «Физиология – медицине» (Красноярск, 2012 г.).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 29 печатных работ, из них 6 статей – в центральных реферируемых журналах, рекомендованных ВАК. Получен патент № 2436099, приоритет от 15.07.2010, «Способ прогнозирования гематогенного метастазирования у больных раком молочной железы при проведении противоопухолевого лечения».

**Внедрение.** Положения и выводы выполненной работы используются в учебном процессе на кафедре иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО

«Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России в разделе «Клиническая иммунология опухолевого роста».

**Личный вклад соискателя** состоит в анализе источников литературы по теме исследования, разработке дизайна исследования, осуществлении сбора анамнестических данных, получении и анализе исходных клинических и лабораторных данных, в создании и статистической обработке электронной базы данных, обсуждении результатов, подготовке к печати публикаций и оформлении диссертационной работы.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация изложена на 199 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3 глав, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 18 рисунками. Список литературы включает 307 источников, в том числе 92 отечественных и 215 иностранных авторов.

## ГЛАВА 1

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### **1.1. Особенности функционирования иммунной системы при злокачественных новообразованиях**

##### **1.1.1. Механизмы противоопухолевого иммунитета**

Впервые предположение о наличии механизмов, ограничивающих рост злокачественных клеток, высказал П. Эрлих, основываясь на положении, что их мембраны могут быть изменены и представляться организму как чужеродные антигены [165]. В последующем это положение получило подтверждение благодаря исследованиям в области иммунологии и изучению роли иммунной системы в патогенезе многих заболеваний [49].

В настоящее время доказано, что иммунная система способна влиять на опухоль [278]. О том, что функционирование иммунной системы имеет значение в возникновении и развитии злокачественных опухолей, убедительно свидетельствуют такие факты, как существование редких спонтанных регрессов опухолей различного типа у человека, длительный скрытый период развития отдельных метастазов после хирургического удаления первичного опухолевого узла, относительно высокая концентрация иммунокомпетентных клеток в опухолевой ткани, высокий риск развития злокачественных новообразований после иммуносупрессивной терапии по поводу трансплантации органов и тканей [49].

Предполагается, что опухолевые клетки образуются в организме довольно часто и, если они иммуногенны, то легко элиминируются иммунной системой. Опухолям, достигшим клинических размеров, уже ранее тем или иным способом удалось избежать иммунного надзора [124].

Изменение антигенных свойств и набора поверхностных или секретируемых метаболитов индуцирует противоопухолевую реакцию иммунной системы [42]. Причинами приобретения антигенных свойств опухолевыми клетками являются:

1) появление новых или изменённых антигенов – опухолеспецифичных антигенов;

2) появление антигенов, выявляемых лишь на определённых этапах эмбрионального развития организма – эмбриоспецифичных или онкофетальных антигенов;

3) гиперпродукция антигенов, имеющих у нормальных клеток – опухолеассоциированных антигенов;

4) отсутствие антигенов, характерных для зрелых соматических клеток – дифференцировочных антигенов [42].

Выделяют четыре группы опухолевых антигенов, различающихся по своему происхождению:

1) вирусспецифические антигены вирусов человека, вызывающих злокачественное перерождение клеток, таких, как EBV, HTLV-I, HBV, HCV, HSV, HPV;

2) специфические опухолевые антигены, синтезирующиеся преимущественно в опухолевой ткани и редко экспрессирующиеся в нормальных тканях, за исключением герминогенных: MAGE, BAGE, GAGE, RAGE, LAGE;

3) неоантигены, появляющиеся в результате соматических мутаций: FLICE, CDK-4;

4) клеточные белки, контролирующие деление опухолевых клеток, например, теломераза [20].

В механизмах противоопухолевого иммунитета могут участвовать антигеннеспецифические компоненты иммунной системы (фагоциты посредством продукции кислородных радикалов, гидролитических ферментов, TNF $\alpha$ ; естественные киллерные (NK) клетки путем реализации антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и спонтанной цитотоксичности) и факторы адаптивного иммунитета (Т-цитотоксические лимфоциты (CD8+) и антитела). Регуляцию антигенспецифических реакций осуществляют главным образом Т-хелперы типа 1 (Th1) (посредством IL-2,

IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-3), опосредуя вовлечение макрофагов, НК, Т-цитотоксических лимфоцитов [42].

На ранних стадиях заболевания основную роль в противоопухолевой защите играют цитотоксические Т-лимфоциты. Однако такая ситуация сохраняется лишь до тех пор, пока на поверхности опухолевой клетки в достаточном количестве экспрессируются молекулы главного комплекса гистосовместимости первого класса (МНС-I) [52].

По мере нарастания процесса малигнизации интенсивность экспрессии молекул МНС-I снижается, вплоть до полной их утраты, и тогда естественные киллеры (НК, CD16+CD56+-клетки) начинают играть основную роль в противоопухолевой защите, осуществляя антиген-независимый лизис клеток [75, 128].

НК-клетки способны осуществлять цитотоксическое повреждение клеток несущих либо чужеродные (мутантные) МНС-I, либо МНС-дефектные мишени, возникающие в ходе нормальной цитодифференцировки или при патологических процессах (инфекции, опухоли) [226].

Опухолевые клетки являются мишенями для НК, так как им присуще отсутствие или низкая экспрессия молекул МНС-I, экспрессия лигандов для соответствующих рецепторов (NCR), молекулы CD56, образование комплекса «опухолевый антиген+антитело» [72].

Основная роль в реализации противоопухолевого потенциала иммунной системы принадлежит, по-видимому, лимфоцитам, инфильтрирующим опухоль (TIL). В последние годы их роль интенсивно изучается при раке почки, колоректальном раке, меланоме, раке яичника. Свойства TIL и их взаимодействие с опухолевыми клетками во многом определяют прогноз заболевания. TIL включают в себя лимфоциты разных субпопуляций. При прогрессировании заболевания число их резко снижается. В метастатических узлах TIL значительно меньше, чем в первичной опухоли, причём среди TIL практически отсутствуют Th1 [166].



Лимфоциты, окружающие опухоль, могут препятствовать её метастазированию, о чём можно судить по большей выживаемости (более 5 лет) больных с опухолями, окружёнными лимфоцитарным барьером, по сравнению с больными, опухоли которых его не имели [87].

В настоящее время пристальное внимание уделяется изучению роли цитокинов в противоопухолевых иммунных реакциях. Цитокины называют эндогенными иммуномодуляторами из-за их способности усиливать активность цитотоксических лимфоцитов, естественных киллеров, активность макрофагов и индукцию синтеза антигенов гистосовместимости и др. [40].

Неиммунологические механизмы противоопухолевых и антиметастатических эффектов цитокинов связаны с их ролью как негативных факторов роста. Например, показано, что включение интерферонов в схемы лечения сопровождается накоплением в крови ингибиторов клеточной пролиферации, причём положительный эффект интерферонотерапии чётко коррелирует со снижением в крови больных трансформирующих факторов роста [23].

Повышение распознавания опухолевых клеток соответствующими иммунными эффекторами, которое происходит благодаря активации цитокинами поверхностных рецепторов и антигенов на мембране клеток-мишеней, является основным элементом иммуноопосредованных эффектов цитокинов [4].

Обсуждается концепция, согласно которой в процессе возникновения и развития опухоли происходит нарушение баланса между секрецией «проопухолевых» - (IL-6, кислотолабильная фракция  $IFN\alpha/\beta$ ), «противоопухолевых» - (IL-2, кислотостабильная фракция  $IFN\alpha/\beta$ ,  $TNF\beta$ ), а также регуляторных ( $IFN\gamma$ ) цитокинов [52].

Известно, что злокачественная трансформация тканей развивается в условиях нарушенных межклеточных взаимодействий, и, в свою очередь, оказывает существенное влияние на состояние иммунного гомеостаза, что в

значительной мере определяет исход течения и прогноз онкологического заболевания. Предлагается ряд концепций иммунной резистентности опухолей. Одним из важных факторов появления и дальнейшей прогрессии опухоли является ускользание опухолевых клеток от надзора иммунной системы. Обсуждаются следующие механизмы «ускользания»:

- слабая экспрессия опухолевых антигенов на мембране опухолевой клетки, которая часто сопровождается недостаточной экспрессией и утратой опухолевыми клетками некоторых типов молекул HLA-I, необходимых для распознавания антигенных пептидов опухолевых клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами (применительно к РМЖ этот механизм подробно изучен Н.Н. Тупицыным (2005), [81, 92, 192];

- недостаточная иммуногенность антигенов опухоли (или их отсутствие) [304];

- отсутствие экспрессии на опухолевых клетках костимулирующих молекул CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2), которые распознаются корцептором CD28 без сигнала, поступающего с корцептора, и тогда, вместо активации развивается анергия Т-лимфоцитов [9];

- индукция опухолевым антигеном образования «экранирующих» антител, которые защищают злокачественные клетки от действия цитотоксических Т-лимфоцитов [9];

- выделение опухолевыми клетками растворимых форм мембранных антигенов или синтез секреторных вариантов антигенов, «перехватывающих» эффекторы иммунной системы [9];

- отбор тех вариантов мутаций, на которые факторы специфической защиты не реагируют [9];

- периферическая локализация опухолевых клеток, которая затрудняет попадание значимого количества опухолевых антигенов в лимфоидные органы, что может приводить к презентации опухолевых антигенов антиген-представляющими клетками вне связи с костимуляторными сигналами

(молекулы В-7). Следствием является развитие толерантности опухолеспецифических Т-лимфоцитов вместо их активации [51, 262];

- нарушение механизма презентации антигенов «профессиональными» антиген-представляющими клетками Т-лимфоцитам [257].

То есть неэффективность иммунной системы по отношению к опухоли во многом связана именно с антигенной невыразительностью злокачественного новообразования [8].

Известно, также, что в процессе опухолевой прогрессии наблюдаются изменения стромы в виде снижения количества основного вещества, увеличения числа коллагеновых, эластических волокон и появления лимфоплазмочитарных инфильтратов [146].

Таким образом, наиболее существенными причинами, с которыми связана невозможность адекватного иммунного ответа на опухоль, считаются: отсутствие протективных опухолевых антигенов; индуцирование опухолью периферической селекции Т-лимфоцитов и нарушение функций иммунокомпетентных клеток в опухолевом очаге; дисбаланс цитокинов, которые продуцируются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами и формирование на основе перечисленных выше механизмов патологической иммунологической толерантности [43, 52, 75].

Клинические признаки иммунологических расстройств являются важным условием их выявления. Наиболее часто для обозначения клинических вариантов проявления иммунопатологии используется классификация, согласно которой выделяют инфекционный синдром (нарушение иммунного ответа, следствием которого являются рецидивирующие и хронические вирусные, бактериальные, паразитарные, грибковые заболевания), аллергический (специфическая повышенная реакция на определённый антиген-аллерген), аутоиммунный (патологические состояния при которых иммунная система воспринимает собственные антигены, как «чужие» и вырабатывает к ним аутоантитела), иммунопролиферативный (развитие опухолей иммунной системы). Для

выявления иммунопатологических синдромов исследование проводится в два этапа: 1) анкетирование с использованием карты диагностики иммунной недостаточности, 2) лабораторное исследование иммунного статуса. Необходимо иметь в виду, что у некоторых индивидов с выраженными клиническими симптомами иммунной недостаточности при лабораторном исследовании не выявляется каких-либо отклонений от нормы. И, наоборот, при выраженных лабораторных изменениях могут отсутствовать клинические признаки иммунопатологического синдрома. В первом случае диагностируют иммунопатологию, во втором – пациента включают в группу риска по иммунопатологии [18].

Иммунодепрессивное воздействие опухоли обусловлено её способностью угнетать иммунокомпетентные клетки на тканевом уровне при трансформации единичной малигнизированной клетки в колонию клеток; вызывать системную иммуносупрессию посредством секреции супрессорных факторов; индуцировать механизмы общей иммунодепрессии, обусловленные нарушением процессов регуляции и обмена веществ [8].

Комплекс негативных изменений в иммунной системе онкологических больных, вызванных расстройством обмена веществ называется метаболической иммунодепрессией [17, 85]. При её развитии основными патогенетическими факторами выступают: 1) провоспалительные цитокины (преимущественно IL-1 и TNF $\alpha$ ); 2) глюкокортикоиды; 3) метаболиты углеводного и липидного обменов – глюкоза и неэстерифицированные жирные кислоты [8].

На ранних стадиях опухолевой прогрессии, когда на поверхности опухолевых клеток в достаточном количестве экспрессируются молекулы МНС-I, очевидна основная защитная роль CD8 $^{+}$ -цитотоксических лимфоцитов. Уже в эту фазу развития прирост концентрации метаболитов опухоли способен оказывать негативное влияние на функционирование иммунной системы, что сопровождается подавлением активности Th1- и сохранением активности Th2-лимфоцитов [8].

Активация тканевых макрофагов и секреция ими IL-1 и TNF $\alpha$  является типовой реакцией их на малигнизированные клетки [12, 46, 118].

IL-1 имеет наиболее широкий спектр биологической активности по сравнению с другими цитокинами. В частности, IL-1 способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и проникать в мозг, стимулируя в паравентрикулярном ядре гипоталамуса секрецию кортикотропин-релизинг гормона, который, в свою очередь, повышает продукцию гипофизом адренкортикотропного гормона, индуцирующего выброс из коры надпочечников глюкокортикоидных гормонов [5, 16]. При развёртывании острой фазы воспаления это ведёт к усилению воздействия факторов стресса на все системы и оказывает мощный ингибирующий эффект на экспрессию интерлейкиновых генов, что сдерживает активацию иммунной системы. Избыток глюкокортикоидов уменьшает количество циркулирующих Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов, а также ограничивает способность макрофагов к фагоцитозу и киллингу злокачественно трансформированных клеток [38].

Повышение продукции глюкокортикоидов усиливается гипоталамическим влиянием на систему углеводного гомеостаза [17].

При прогрессировании онкологических заболеваний прослеживается ранний и устойчивый прирост концентрации TNF $\alpha$ , который обеспечивается как минимум двумя аддитивными механизмами. Во-первых, при опухолевой прогрессии происходит селекция клеток, обладающих резистентностью к цитотоксическому воздействию TNF $\alpha$ , во-вторых, экспрессируемые опухолевыми клетками антигены индуцируют повышенную продукцию TNF $\alpha$ . Регуляторные эффекты TNF $\alpha$  затрагивают практически все ткани (рецепторы к данному цитокину не выявлены только на мембране эритроцитов) [11, 105].

Воздействие TNF $\alpha$  на организм носит системный характер. TNF $\alpha$  индуцирует синтез белков острой фазы, активирует сторожевую полисистему плазмы крови, подавляет деление гемопоэтических стволовых клеток, что

приводит к развитию анемии, лимфопении и формированию значимых субпопуляционных дисбалансов клеток иммунной системы [14, 105].

Системное воздействие на организм TNF $\alpha$  совместно с IL-1 и IL-6 сопровождается развитием продромального синдрома, проявляющегося снижением аппетита, сонливостью, лихорадкой, повышением болевой чувствительности [154, 295].

TNF $\alpha$  инициирует активность эндокринных желёз, что приводит к увеличению уровня адренокортикотропина, гонадотропина и других гуморальных факторов, снижающих функциональную активность иммуноцитов [89]. В более высоких концентрациях TNF $\alpha$  вызывает симптомы септического шока, а также кахексию, особенно на поздних стадиях опухолевого процесса, стимулирует липолиз, индуцирует метаболическую иммунодепрессию [8].

По ходу опухолевой прогрессии организм всё в большей степени использует универсальный вариант реакции – воспалительный тип ответа на новообразование. Смена стратегии резко расширяет круг клеток-эффекторов. Их активация сопровождается повышением уровня провоспалительных цитокинов в крови, что ещё больше усиливает продукцию глюкокортикоидов [8].

Таким образом, повышение уровня глюкокортикоидов, сопровождающее злокачественные новообразования, является аддитивным результатом действия эффекторов иммунной системы и метаболической стимуляции. Гипогликемическое давление, возникшее в ранний период онкологического заболевания как следствие реакции иммунокомпетентных клеток на злокачественно трансформированные клетки, по мере опухолевой прогрессии приобретает структуру порочного круга, в котором глюкокортикоиды в постоянно возрастающей концентрации становятся ведущим патогенетическим звеном метаболической иммунодепрессии [8].

Ряд иммуносупрессорных белков, секретируемых опухолью, являются маркёрами опухолевого роста (онкомаркёрами).

$\alpha$ -фетопротеин подавляет синтез ряда цитокинов и экспрессию белков гистосовместимости на мембране макрофагов [171].

Хорионический гонадотропин ингибирует продукцию IL-2 и увеличивает процент Treg в популяции T-клеток и активность в этих клетках фосфатидилинозитол-3-киназы – фермента, контролирующего каскад регуляторных цитопротективных реакций [8].

Раковый эмбриональный антиген стимулирует продукцию лимфоцитами человека белкового фактора, супрессирующего митоген-индуцированную активацию лимфоцитов [8].

Трофобластический  $\beta$ 1-гликопротеин (SP1) угнетает функциональную активность нейтрофилов, усиливает генерацию супрессорных субпопуляций лимфоцитов и ингибирует синтез иммуноглобулинов различных классов плазматическими клетками [88, 89].

Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF) интенсивно вырабатывается и секретируется вступившими на путь малигнизации трансформированными клетками. MIF ингибирует миграцию макрофагов, оказывает негативное воздействие на активацию нейтрофилов, фагоцитоз и лизис внутриклеточных паразитов. Под действием этого фактора снижается активность NK-клеток [88, 89].

Считается, что критическая масса первичного опухолевого узла не превышает 1 грамма. В этом случае его размер составляет в диаметре 1-2 мм, а количество клеток – около 1 миллиарда. Рост первичного опухолевого узла ограничивается поступлением питательных веществ путём диффузии, клеточным микроокружением и эффекторными механизмами иммунной системы. Баланс пролиферации и апоптоза клеток опухоли может сохраняться много лет, не создавая никаких проблем для организма («дремлющие опухоли») [8].

Эффекторы врождённого противоопухолевого иммунитета (дендритные клетки, макрофаги, NK-клетки и нейтрофилы) способны

распознавать единичные трансформированные и малигнизированные клетки и уничтожать их [8].

Иммунная толерантность малигнизированных клеток проявляется на мембранном, цитоплазматическом и генетическом уровнях [8].

Помимо секреции TNF $\alpha$  и IL-1, реакция макрофагов на малигнизированные клетки выражается усилением продукции провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и других активных молекул [16].

Провоспалительные цитокины способны, посредством индукции тканевого фактора свёртывания крови, формировать фибриновый защитный барьер, защищающий опухоль от цитотоксических клеток иммунной системы [65].

Взаимодействуя между собой, молекулы муцина слизи формируют непрерывный сетчатый слой, который является механическим барьером для клеток иммунной системы [8].

Блокада распознавания может обеспечиваться процессами подавления цитотоксической активности НК-клеток и/или нейтрализации продуцируемых ими цитотоксических агентов, индуцированием апоптоза клеток иммунной системы, а также сбрасыванием рецепторов с поверхности опухолевых клеток (шеддинг) [8].

Обменные процессы опухолевых клеток характеризуются преобладанием реакций восстановления над реакциями окисления [68, 207], что приводит к десенситизации рецепторов за счёт восстановления в них дисульфидных связей и разобщения субъединиц рецепторного комплекса с его структурной дезорганизацией и изменением функциональных характеристик [90].

Ограничение чувствительности рецепторов опухолевых клеток к регуляторным молекулам, в частности к цитокинам, предопределяет прирост концентрации последних и их существенное побочное влияние на рецепторы нормальных клеток. Итогом неравнозначной чувствительности нормоцитов и малигнизированных клеток к действию цитокинов может быть расстройство



у онкологических больных функциональной активности иммунной системы и общего метаболизма [8].

Белки теплового шока (HSP), образуя комплекс из экзоантигена и самого белка на предшествующем распознаванию опухолевого антигена этапе, играют роль гуморальных факторов сопряжения между неспецифической и адаптивной составляющими иммунитета. Внеклеточный комплекс «экзоантиген – HSP» распознаётся антигенпрезентирующими клетками как специфический лиганд, а затем с участием цитоплазматических HSP ассоциируется с MHC-I и презентуется ими для распознавания CD4+- и CD8+Т-лимфоцитом [108]. Таким образом, белки теплового шока совместно с фагоцитирующими и антигенпрезентирующими клетками формируют единую систему биологического сопряжения естественной резистентности и адаптивного иммунитета [8].

В присутствии HSP70 отменяется цитолитическое действие TNF $\alpha$  на опухолевые клетки [8]. Молекулярный механизм цитопротективного действия HSP70 связывают с его депрессирующим влиянием на процесс освобождения из митохондрий и/или активность митохондриальных проапоптотических факторов – цитохрома С [151], апоптозаактивирующего фактора (Araf) [295], апоптозиндуцирующего фактора (AIF) [155]. Кроме этого, HSP70 облегчает прохождение антиапоптотического сигнала, опосредованного NF- $\kappa$ B, при воздействии TNF $\alpha$  на опухолевые клетки [280].

Опухолевые клетки способны индуцировать апоптоз цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток, несущих на мембране Fas-рецептор, посредством мембранной или растворимой формы Fas-лиганда. Результатом связывания рецептора с лигандом является генерация управляющего сигнала и его последующее движение по внутриклеточной сигнальной коммуникации системы FasL – Fas:

FasL  $\rightarrow$  Fas  $\leftrightarrow$  Fas\*  $\rightarrow$  MORT/FADD  $\leftrightarrow$  MORT/FADD\*  $\rightarrow$  каспаза 8  $\leftrightarrow$  каспаза 8\*  $\rightarrow$  каспаза3  $\leftrightarrow$  каспаза3\*  $\rightarrow$  DFF45/ICAD  $\leftrightarrow$  DFF40/CAD\*  $\rightarrow$  фрагментация ДНК  $\rightarrow$  клеточная гибель по механизму апоптоза [8, 272].

Злокачественно трансформированные клетки способны также секретировать растворимые формы Fas-рецептора, блокирующего мембранный Fas-лиганд цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток, вследствие чего снижается эффективность их цитотоксического действия на опухолевые клетки, экспрессирующие Fas-антиген. Секретируемая злокачественно трансформированными клетками растворимая форма Fas-рецептора может быть продуктом протеолитического расщепления мембраносвязанных рецепторов и альтернативного сплайсинга [8].

Главные составляющие врождённого противоопухолевого иммунитета – макрофаги и NK-клетки – сохраняют способность опознавать единичные малигнизированные клетки и имеют соответствующий эффекторный потенциал для реализации цитотоксичности. Однако неограниченный пролиферативный потенциал злокачественного клона превышает возможности эквивалентного ответа на опухоль факторов врождённого иммунитета, а механизмы инициации адаптивной составляющей иммунитета активно нейтрализуются опухолью [8].

Из всего спектра цитокинов и хемокинов, которые избирательно секретируются опухолью и обеспечивают её интеграцию в систему общего жизнеобеспечения организма, ключевая роль отводится цитокинам с системными эффектами: IL-1 и TNF $\alpha$  [8].

В контексте вопроса о цитоплазматических механизмах иммунной резистентности опухолевых клеток, которые обеспечиваются негативной модуляцией апоптотического и антипролиферативного сигнала цитокинов, возможна реализация следующих механизмов. Восстановленное состояние тиоловых групп в структуре молекул сигнального звена цитоплазмы способствует прохождению сигналов различного характера. Однако восстановленные тиоловые группы связывают свободные радикалы, нейтрализуют их и препятствуют модификации их субстратов. В итоге ограничивается проапоптотическое влияние цитокинов семейства TNF, а апоптоз не реализуется [231, 284].

Депрессия антипролиферативной и проапоптотической составляющих действия цитокинов на малигнизированные клетки достигается уменьшением выраженности и интенсивности реакций протеолиза, которые в свою очередь обеспечиваются активностью протеасомы и/или соответствующих каспаз [7]. Считается, что в определённых обстоятельствах иммунная система не только не отторгает опухоль, но и участвует в её развитии [119].

### **1.1.2. Негативная роль иммунной системы при опухолевом росте**

В последние годы появились доказательства того, что воспаление, направленное на борьбу с инфекцией, или при заживлении ран, и, как правило, являющееся атрибутом многих предраковых изменений или доброкачественных пролиферативных процессов, обеспечивает поддержку и усиление многих неопластических свойств клеток, таким образом, промотируя опухолевый процесс. Основными эффекторными и регуляторными компонентами воспалительной реакции являются клетки иммунной системы. У опухоли имеется способность активно избегать повреждающего действия клеток иммунной системы, взаимоотношения которой с опухолью носят двойственный характер: с одной стороны, возможность осуществлять противоопухолевые реакции, с другой – поддерживать и даже стимулировать опухолевый рост [188].

Наблюдения об инфильтрации опухолей различных локализаций иммунокомпетентными клетками первоначально расценивались исключительно как свидетельства противоопухолевого ее действия, и действительно, для этого были определенные экспериментально и клинически подтвержденные основания. Однако на протяжении последнего десятилетия удалось четко показать, что опухолеассоциированный воспалительный ответ иммунной системы может выполнять парадоксальную, а именно, промотирующую опухоль функцию, и способствовать приобретению опухолевыми клетками «раковых» свойств. Клетки иммунной системы продуцируют биоактивные молекулы в опухолевое микроокружение: ростовые факторы, стимулирующие пролиферацию,

антиапоптотические факторы, проангиогенные, молекулы, ферменты, ремоделирующие внеклеточный матрикс, сигнальные молекулы, активирующие эпителиально-мезенхимальный переход, что обеспечивает ангиогенез, инвазию и метастазирование [152, 239, 240, 252]. Воспалительная инфильтрация может способствовать развитию опухоли, и, кроме того, реактивные формы кислорода (реактивные кислородные метаболиты), продуцирующиеся воспалительными клетками, обладают мутагенным эффектом, обеспечивая усиление генетической нестабильности [186]. Все это доказывает принципиально важную роль иммунной системы в приобретении ключевых характеристик опухолевыми клетками.

В начале 70-х годов прошлого века был описан феномен супрессии иммунного ответа, опосредованный Т-клетками, однако к концу 80-х годов сообщество иммунологов пришло к выводу о необоснованности сложившихся представлений о природе супрессорных Т-клеток, и их изучение практически прекратилось [91].

В середине 90-х годов прошлого века была описана субпопуляция CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, способных предотвращать развитие аутоиммунного воспаления, которые получили название Treg (регуляторные Т-клетки) [201]. К настоящему времени накоплен огромный материал, свидетельствующий о том, что различные субпопуляции регуляторных Т-клеток – CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, а также NKT-клетки играют существенную роль в контроле аутоиммунных процессов, а также иммунного ответа на аллотрансплантаты, аллергены, инфекционные агенты и опухолевые клетки [34, 281].

Наиболее серьезно обосновано наличие регуляторных функций у субпопуляции CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -цепь рецептора IL-2 (CD25) [91].

Численность и активность Treg-клеток регулируются генетически: показано, что у мышей линии BALB/c их больше, чем у мышей C57BL/6 [266].

Регуляторные CD4<sup>+</sup>T-клетки включают в себя естественные «профессиональные», продуцируемые тимусом полностью дифференцированные супрессорные клетки CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Treg [259], и регуляторные T-клетки, возникающие из наивных или покоящихся периферических CD4<sup>+</sup>-T-клеток в процессе ответа на антиген: Tr1- и Th3-клетки (супрессорная активность обусловлена продуцируемыми ими цитокинами – IL-10 и TGF- $\beta$  соответственно) [34].

При большинстве злокачественных опухолей (рак лёгкого, желудка, яичников, молочной железы, пищевода и др.) численность Treg-популяции увеличивается до 12-21% [259]. Однако на ранних стадиях увеличение Treg незначительно. Данное увеличение чаще наблюдается у пациентов с распространёнными заболеваниями, при появлении метастазов [34].

В настоящее время Treg-лимфоциты рассматриваются в качестве главных ингибиторов индукции противоопухолевого иммунитета [136].

У онкологических больных часто регистрируются изменения параметров иммунного статуса в сравнении со здоровыми [6, 35, 36, 56]. Отмечено, что рост большинства злокачественных новообразований сопровождается значительными нарушениями различных звеньев иммунного ответа (уменьшение числа T-лимфоцитов и их субпопуляций, числа и функциональной активности естественных киллеров) [35].

Наиболее часто регистрируются следующие дисфункции клеточного звена иммунной системы: нарушение антигенпредставляющей функции дендритных клеток и эффекторной функции T-лимфоцитов; уменьшение пролиферативного индекса и экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц рецептора IL-2, а также матричной РНК гранзима В; нарушение баланса «проопухолевых», «противоопухолевых» и «регуляторных» цитокинов. Эти дисфункции в наибольшей степени характерны для инфильтрирующих опухоль клеток [12, 43, 52].

Активность гуморального звена иммунитета остаётся нормальной и достаточно долго вообще не зависит от степени опухолевой прогрессии [66,

119]. По данным F. Balkwill и A. Mantovani (2001) нормальная активность гуморальной составляющей иммунитета оказывается фактором, способствующим прогрессированию злокачественного новообразования. Противоопухолевые антитела не только не обладают протективными свойствами, но и экранируют опухолевые клетки от действия эффекторов клеточного иммунитета [119].

По данным Орловой Р.В. с соавт. (2007), иммунный статус больных распространённым РМЖ до начала противоопухолевого лечения характеризовался достоверным снижением количества зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD4+), NK (CD56+) и угнетением функциональной активности нейтрофильных фагоцитов, а также уменьшением количественного содержания Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8+) и снижением соотношения CD4+/CD8+. В гуморальном звене отмечались тенденция к увеличению концентрации сывороточных иммуноглобулинов (IgA, IgG) и умеренное увеличение содержания циркулирующих иммунных комплексов в периферической крови. В целом, по мнению авторов, иммунный статус женщин, больных распространённым РМЖ, отражает влияние опухолевой иммуносупрессии с преимущественным угнетением специфического (Т-лимфоциты) и неспецифического (нейтрофильные фагоциты, NK-клетки) клеточного иммунитета [56]. Цитокиновый профиль характеризовался, с одной стороны, повышением концентрации провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-6, а с другой – увеличением содержания ключевых медиаторов Th2 (IL-4), ответственных за активацию системного гуморального иммунитета. Снижение субпопуляции иммунорегуляторных клеток (CD4+) и смещение баланса в сторону Th2, по мнению исследователей, свидетельствует о том, что распространённый РМЖ сопровождается глубокой клеточной иммуносупрессией и нарушением цитокиновой регуляции [56].

Являются ли описанные особенности иммунного статуса больных фоном для возникновения опухоли или же следствием её развития, не всегда возможно выяснить однозначно.

## **1.2. Пути преодоления несостоятельности противоопухолевого иммунитета**

Как было указано выше, сам факт развития опухоли свидетельствует о недостаточности противоопухолевого иммунитета у онкологического больного и успешном «ускользании» опухоли из-под иммунного воздействия. На протяжении ряда лет идёт поиск путей преодоления несостоятельности противоопухолевого иммунитета. Данные исследования ведутся по ряду направлений. Определённые успехи достигнуты в применении иммунотерапии при лечении некоторых онкологических заболеваний.

Цель специфической иммунотерапии – преодолеть барьеры, стоящие на пути развития эффективного противоопухолевого иммунного процесса, посредством увеличения количества в организме сенсibilизированных Т-лимфоцитов, способных реагировать на опухольассоциированные антигены по вторичному типу [33].

Эффективность активной специфической иммунотерапии связана с воздействием по двум основным направлениям [49]. Во-первых, это стимуляция иммунного ответа путём увеличения продукции цитотоксических антител и количества активированных цитотоксических Т-лимфоцитов. Обычно эффективность активной иммунотерапии коррелирует и с гуморальным, и с клеточно-опосредованным иммунным ответом [139]. Во-вторых, это элиминация или существенное снижение факторов иммуносупрессии. TGF- $\beta$ , IL-10, ганглиозиды и другие молекулы модулируют иммунный ответ. Высокий уровень опухольассоциированных антигенов из-за активного распространения опухоли может быть причиной толерантности к иммунизации против подобных агентов, преодолеть которую эффективнее всего путём удаления опухоли [49].

С помощью экспериментов на животных удалось продемонстрировать, что выделенные из злокачественных меланоцитов ганглиозиды, такие как GM2, могут инициировать продукцию IgM. При этом увеличение уровня IgM-антител способствует удалению этих гликолипидов из циркуляции и ослаблению их иммуносупрессивного действия [255].

Доказано, что мутированные онкогены стимулируют экспрессию генов и секрецию соответствующих цитокинов [74]. Опухольассоциированные антигены, потенциально пригодные для изготовления вакцин, обнаружены у пациентов с раком молочной железы, мочевого пузыря, предстательной железы, толстой кишки, яичников, лёгких, поджелудочной железы, шейки матки, меланомой, саркомой Юинга, альвеолярной рабдомиосаркомой, хроническим миелолейкозом [71]. Методом пассивной иммунизации антителами к опухольассоциированным антигенам удаётся достичь ремиссии РМЖ [177], В-клеточной лимфомы [110] и рака толстого кишечника [254].

Наиболее высокоиммуногенными и безвредными с точки зрения аутоиммунной патологии при раке молочной железы оказались вакцины, приготовленные из эпитопов таких антигенов, как муцин-1 [112], HER2/neu [181], меланома-ассоциированный антиген 3 типа (MAGE3) и остальные антигены семейства MAGE [107], маммаглобин [228] или раковоэмбриональный антиген [274]. Также изучаются и другие антигены, например, циклин В1 [195] или раковые антигены зародышевых линий, специфичные для рака молочной железы [132, 176].

В качестве адъювантов для приготовления противоопухолевых вакцин используются такие цитокины, как IL-2, IL-12, IL-4, а также некоторые другие [260]. Изучается сочетанное применение IL-1 и IL-2 [76]. Перспективным считается использование интерлейкинов (IL-1, IL-2, IL-6, IL-11 и др.), имеется клинический опыт в отношении IL-1 и IL-2 (IL-1 $\beta$  – беталейкин, IL-2 – пролейкин, альдеслейкин, ронколейкин) [41]. Механизмы влияния связаны со стимуляцией иммунного ответа за счёт активации Т-клеток, усиления синтеза других цитокинов, стимуляции роста естественных



киллеров и усиления их цитотоксичности, стимуляции роста и синтеза антител В-клетками [41]. Активность естественных киллеров и лимфокинактивированных киллеров достаточно легко индуцируется стимуляцией лимфокинами (интерлейкинами и интерферонами). Однако проблемой является низкая специфичность иммунных эффекторных клеток, а также выраженные побочные эффекты, вызываемые лимфокинами [71].

Генная терапия клетками, модифицированными с помощью генов цитокинов (IL-2, интерферонов, ГМ-КСФ), костимулирующих молекул, а также приготовление рекомбинантных и синтетических вакцин на основе клонирования опухольассоциированных антигенов начала применяться с конца 80-х годов [50]. Интерфероны усиливают функциональную активность естественных киллеров, повышают экспрессию CD95<sup>+</sup>-, CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов. Механизм действия интерферонов может включать активацию процессов апоптоза, при этом наибольшая эффективность интерферонотерапии достигается у пациентов с исходно ненарушенными показателями иммунного статуса [41].

Сравнительно недавно было показано, что уменьшение количества Treg приводит к активации ареактивных CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, а также неспецифических NK-подобных эффекторных клеток [34].

Одним из подходов к ингибции активности Treg является использование малых доз циклофосфида. Ещё в 1980-х годах было показано, что малые дозы циклофосфида способны усиливать противоопухолевый иммунный ответ. Введение циклофосфида мышам в дозе 2 мг уменьшало количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клеток в их лимфатических узлах и селезёнке [34]. Treg, полученные от мышей, леченых циклофосфидом, в значительно меньшей степени ингибировали пролиферативный ответ CD8<sup>+</sup>- и CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-клеток и были более чувствительны к индукции апоптоза *in vitro* и *in vivo* [211]. Т-хелперы могут способствовать снятию толерантности к персистирующим антигенам и

разрушению уже развившейся опухоли, но эффект проявляется только при одновременном отсутствии Treg [34].

Таким образом, противоопухолевая активность иммунной системы может модулироваться как в результате влияния на эффекторные механизмы, так и за счёт уменьшения супрессорных воздействий, в том числе – на фоне цитостатической терапии.

### **1.3. Иммуноопосредованные эффекты цитостатической и лучевой терапии**

Накоплено большое количество свидетельств того, что механизмы врождённого и адаптивного иммунитета вносят существенный вклад в противоопухолевый эффект традиционного противоопухолевого лечения, основанного на химиотерапии и радиотерапии, в частности при лечении рака молочной железы [202].

Проблема заключается в том, что даже в случаях, когда основная опухоль была полностью удалена, сохранившиеся дремлющие микрометастазы опухолевых клеток могут привести к рецидиву опухоли. Для полного излечения недостаточно использования только традиционных методов лечения (хирургический, химио- и лучевая терапия). Необходимо пытаться стимулировать иммунный ответ для того, чтобы иммунная система могла держать остаточные опухолевые клетки под контролем [307].

Исторически программы по разработке противоопухолевых лекарств игнорировали возможность того, что иммунные реакции могут вносить вклад в эффективность лечения. Скрининг новых химиопрепаратов проводился на иммунодефицитных мышах с привитыми человеческими опухолями [222]. Хотя противораковая химио- и радиотерапия обычно рассматривается как стратегия, при которой повреждаются главным образом опухолевые клетки, накопленные данные свидетельствуют, что цитотоксические препараты также влияют на иммунную систему, внося вклад в регрессию опухоли [202].

Показано, что иммунная система при воздействии противоопухолевой химиотерапии активируется через повышение иммуногенности опухолевых

клеток, транзитное лимфоидное истощение, при помощи ослабления иммуносупрессорных механизмов или через прямые или не прямые стимулирующие воздействия на иммунные эффекторы [202].

Кроме того, вакцинация против раковоспецифичных антигенов может сделать опухоль чувствительной к последующему химиотерапевтическому лечению. Задача заключается в избирательном воздействии на иммунную систему больного таким образом, чтобы она смогла контролировать некоторую остаточную опухоль. Антигенный стимул побуждает иммунную систему к контролю оставшихся опухолевых клеток [202].

Индукцированная химиотерапией смерть опухолевых клеток часто (но не всегда) происходит посредством апоптоза, при этом, по общему мнению, продукты апоптоза не являются иммуногенными или толерогенными. Эта закономерность распространяется как на лекарства, уничтожающие опухолевые клетки через митохондриальный, лизосомальный или эндоплазматически-ретикулярный стресс, так и на ингибиторы протеин-тирозинкиназы, ингибиторы протеасом или ДНК-повреждающие агенты (такие, как алкилирующие агенты или ингибиторы топоизомеразы) [129, 303]. Однако апоптоз сопровождается экспрессией фосфатидилсерина на наружной поверхности плазматической мембраны, что работает как сигнал «съешь меня» и запускает макрофагальный фагоцитоз и продукцию провоспалительных цитокинов [202].

Агенты, повреждающие ДНК, такие, как ионизирующая радиация или ингибиторы топоизомеразы, стимулируют комплексный ответ, который включает в себя активацию опухоль-супрессирующих белков, таких как протеинкиназы АТМ (ataxiatelia mutata) и СНК1 (checkpoint kinase 1) и фактор транскрипции р53. Этот ответ на повреждение ДНК индуцирует экспрессию лигандов NKG2D на опухолевых клетках АТМ-зависимым и СНК1-зависимым (но р53-независимым) способом [285]. NKG2D – рецептор активации, который вовлекает в иммунный надзор НК-клетки, НКТ-клетки,  $\gamma\delta$ Т-клетки и находящиеся в покое (у мышей) и/или активированные (у

людей) CD8<sup>+</sup>-Т-клетки. Несмотря на то, что p53 не является необходимым для экспрессии NKG2D-лигандов в клетках, подвергшихся повреждению ДНК, исследователи делают акцент на важном взаимодействии между p53-индуцированным старением опухолевых клеток и механизмами врождённого иммунитета [263]. Было обнаружено, что восстановление функции p53 в клетках привитого рака печени ведёт к регрессии опухоли, но только в случае, если мыши имеют функционально активные НК-клетки, нейтрофилы и макрофаги. Реактивация p53 в гепатоцеллюлярных раках индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов (IL-15 и M-CSF), адгезивных молекул (интрацеллюлярная адгезивная молекула 1- ICAM1 и адгезивная молекула сосудистых клеток - VCAM1) и хемокинов (CCL2 и CXCL1), которые могут вносить вклад в p53-индуцированное рекрутирование нейтрофилов, макрофагов и НК-клеток в опухоль [263]. Этот пример иллюстрирует, как молекулы, которые активируются во время ответа на повреждение ДНК (ATM, CHK1 и p53), могут привести в состояние готовности систему врождённого иммунитета для реализации противоопухолевого ответа [202].

Кроме того, накапливаются сведения о способности радиотерапии и некоторых цитотоксических соединений стимулировать специфический противоопухолевый иммунный ответ, что вносит определенный вклад в терапевтические эффекты традиционной терапии [202].

Кроме прямых цитотоксических свойств в отношении опухолевых клеток, ионизирующее излучение опосредует множество эффектов на клетки и ткани, некоторые из которых могут стимулировать иммунный ответ. Низкие дозы ионизирующего излучения повышают экспрессию молекул МНС I класса, опухолюассоциированных антигенов (раково-эмбриональный антиген и муцин 1) [161] и CD95 клетками опухоли, а также адгезивных молекул эндотелиальными клетками [224], посредством чего происходит повышение активности цитотоксических Т-лимфоцитов [277] и миграции Т-клеток в направлении облучённой опухоли. При местном облучении опухоли

могут уменьшиться размеры необлучённых метастазов, что опосредовано иммунной системой [202].

В своём исследовании Reits et al. (2006) показали, что облучение повышает антигенность опухоли путём изменения репертуара её белков, которые презентуются иммунной системе [253]. Во-первых, облучение повышает деградацию существующих протеинов, повышая, таким образом, внутриклеточный пул пептидов для презентации МНС-I. Во-вторых, активация мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) в облучённых опухолевых клетках стимулирует трансляцию протеинов и усиливает продукцию пептидов. В-третьих, облучение стимулирует синтез новых протеинов и, следовательно, антигенных пептидов, которые могут быть презентированы для распознавания Т-клетками с разным репертуаром рецепторов [253]. Более того, были описаны потенциальные синергетические эффекты пассивно перенесенных цитотоксических или стимулированных TLR9-лигандами (лиганды для Toll-подобных рецепторов) лимфоцитов [148, 253] и ионизирующей радиации на привитые опухоли [202].

Одним из наиболее выраженных иммуотропных эффектов противоопухолевой терапии обладает лимфопения. Терапевтическая индукция лимфопении вызывает значительный интерес в контексте адоптивного переноса лимфоцитов и вакцинации против меланомы [208]. Представляется, что транзиторная лимфопения повышает эффективность этих видов терапии посредством активации гомеостатических механизмов, которые стимулируют реагирующие на опухоль эффекторные Т-клетки, а также путем ингибирования опухольиндуцированной иммуносупрессии. Обычные методы индукции лимфопении включают низкодозное общее облучение организма, вызывающее обратимую миелосупрессию, лечение одним циклофосфаном или комбинацией циклофосфана с флударабином (усиливает долговременную лимфопению) [131]. В дополнении к элиминации клеток, способных подавлять противоопухолевый ответ (Treg) [235], восстановление пула лимфоцитов после терапии может нивелировать

вызванные раковой опухолью дефекты Т-клеточного иммунитета, наделяя антиген-презентирующие клетки больного ко-стимуляторными функциями и усиливая продукцию цитокинов, таких, как IL-7, IL-15 и IL-21, что приводит к повышению активности CD8<sup>+</sup>-Т-клеток [235]. Лимфоидное истощение также усиливает хоуминг Т-клеток в опухоль и внутриопухолевую пролиферацию эффекторных клеток [104, 131]. Кроме того, полное облучение тела может вызвать повреждение слизистых барьеров, что может привести к активации микрофлоры и массовому высвобождению лигандов TLR4 - липополисахаридов. Было показано, что они повышают активацию дендритных клеток и Т-лимфоцитов и усиливают регрессию опухоли [230]. Исследования, проведённые на животных, показали, что лимфоабляция повышает эффективность адоптивного переноса опухолеспецифичных CD8<sup>+</sup>-Т-клеток [256]. Эта стратегия продемонстрировала положительный эффект в клиническом исследовании, которое включило в себя 35 пациентов с распространёнными метастатическими меланомами, невосприимчивых к традиционным методам лечения [104]. Лимфоидное истощение также может комбинироваться с вакцинацией, которая усиливает дифференцировку Т-клеток памяти, которые способны распознавать собственные опухолевые антигены [101, 191]. Сильное лимфоидное истощение приводит к увеличению количества как адоптивно перенесённых, так и наивных Т-клеток и повышает эффективность терапии адоптивного переноса при опухолевых заболеваниях [191].

Таким образом, лимфоидное истощение, вызванное химио- или лучевой терапией в комбинации с дополнительными манипуляциями (адоптивный перенос клеток, вакцинация или введение аутологичных гемопоэтических стволовых клеток), могут быть перспективными подходами для формирования противоопухолевого иммунного ответа [202].

Наибольший интерес для настоящего исследования представляют сведения, касающиеся иммуномодулирующих эффектов цитостатических препаратов и вклад иммунной системы в эффективность цитостатической

терапии. Химиопрепараты могут применяться в адьювантном (послеоперационном) и неoadьювантном (предоперационном) режимах. Неoadьювантная химиотерапия (НАХТ) позволяет оценить эффективность противоопухолевого действия препаратов у конкретного пациента.

Показано, что высокие дозы циклофосфана имеют прямое туморицидное действие и приводят к иммуносупрессии, тогда как низкие дозы этого препарата опосредуют стимуляцию иммунитета, потенцируя гиперчувствительность замедленного типа [298] посредством воздействия на чувствительную к циклофосфану субпопуляцию Treg [235]. Низкие дозы циклофосфана снижают число и ингибиторные функции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-регуляторных T-клеток путём снижения экспрессии их ключевых функциональных маркёров: скурфина (Foxp3) и глюкокортикоид-индуцированного TNF-рецептор-связанного протеина (GITR) [211]. Воздействие циклофосфана на Treg-клетки и циклофосфан-стимулированная продукция IFN $\alpha$  [149] могут вносить вклад в усиление антительного ответа и персистенцию T-клеток памяти. Все эти эффекты вносят вклад в уничтожение иммуногенных опухолей в синергии со специфической иммунотерапией [183, 279]. Однако удаление регуляторных клеток, возможно, имеет различное значение в зависимости от типа, стадии и локализации опухоли [268]. В небольших по объёму клинических исследованиях показано, что комбинация низких доз циклофосфана в сочетании с вакцинами усиливала ответ по ГЗТ-типу [123, 169], снижала относительное количество супресорных T-клеток [122] и увеличивала выживаемость пациентов с метастатическим раком [169]. Дневная доза орального циклофосфана, назначаемая в течение 1 месяца пациентам с терминальными стадиями рака, может подавить ингибиторные функции Treg-клеток, восстановить пролиферативную способность эффекторных T-клеток и цитотоксическую функцию NK-лимфоцитов [137, 229]. Однако, для оптимизации режима назначения циклофосфана с целью достижения

иммуностимулирующего эффекта у больных раком необходимы дальнейшие рандомизированные исследования [202].

Иммуномодуляция при помощи антрациклина доксорубицина изучалась в течение десятков лет [113, 241]. Недавно было показано, что доксорубин усиливает противоопухолевое действие ГМ-КСФ-трансфецированной вакцины из опухолевых клеток, будучи применён до или после иммунизации [204]. У иммунокомпетентных мышей с сингенными лейкемическими клетками L1210 был изучен антилейкемический эффект комбинации IL-12 и разных цитотоксических агентов (цисплатин, циклофосфан, паклитаксел или доксорубин). Было продемонстрировано, что значимое повышение выживаемости мышей достигается только комбинацией IL-12 и доксорубина [162]. Данный терапевтический эффект утрачивался, когда мышей облучали, или им была сделана инъекция кремния, что показало необходимость присутствия радиочувствительных иммунных клеток (возможно, Т-лимфоцитов) и макрофагов для терапевтического эффекта. Таким образом, можно предположить, что антрациклины, в отличие от множества других цитотоксических агентов могут вызывать иммуногенную смерть клетки [129, 134].

Оба таксана: паклитаксел и доцетаксел связывают  $\beta$ -субъединицу тубулина и нарушают полимеризацию микротрубочек, что приводит к остановке клеточного цикла на стадии G2/M с последующей гибелью клетки. Паклитаксел связывается с мышинными TLR4 (но не с человеческими TLR4) и, таким образом, может имитировать бактериальные липополисахариды, активируя мышинные макрофаги и дендритные клетки через сигнальный путь с участием TLR4, MD2 (ключевые компоненты ЛПС-рецепторного комплекса) и гена белка первичного ответа миелоидной дифференцировки (88) (MyD88) [290]. У мышей, трансгенных по человеческому рецептору эпидермального ростового фактора-2 (HER2/neu), который гиперэкспрессирован в некоторых видах рака молочной железы, толерантных к терапии HER2, лечение паклитакселем повышает эффективность



опухолевых вакцин, экспрессирующих HER2 и ГМ-КСФ [150]. Подобным образом мыши, имеющие аденокарциному молочной железы, трансфицированные кандидатным опухолевым антигеном, более эффективно отвечают на внутриопухолевое введение дендритных клеток, когда они получают паклитаксел [163]. Оптимальный режим лечения паклитакселем в комбинации с ГМ-КСФ-продуцирующей опухолевой вакциной был оценён на опухолевой модели 3LL [164]. Когда мыши с прижившимися опухолями 3LL были предварительно пролечены доцетакселем, а в дальнейшем провакцинированы облучёнными клетками опухоли 3LL, трансфицированными ГМ-КСФ, наблюдалась значимое уменьшение опухоли и увеличение времени жизни в сравнении с одной только химиотерапией. Если доцетаксел был назначен после вакцинации опухолевыми клетками, лечение таксаном отменяло противоопухолевое действие вакцины, возможно, из-за негативного влияния на пролиферацию Т-эффекторных клеток. У мышей, выживших в результате лечения, нарабатывались цитотоксические Т-клетки памяти, специфичные к 3LL-эпитопу (MUT-1); у них появлялась резистентность к повторному введению живых клеток опухоли 3LL. Имеются косвенные свидетельства того, что у людей таксаны могут стимулировать противоопухолевый иммунный ответ. Анализ пролиферативной способности Т-клеток и цитолитической активности НК-лимфоцитов показал, что в группе больных раком молочной железы (стадия II/III), пролеченных таксанами, наблюдалось повышение функциональной активности Т-клеток и НК-лимфоцитов в сравнении с пациентами, леченных без применения таксанов [141]. Следовательно, экспериментальные данные противоречат традиционным представлениям о том, что таксаны подавляют функциональную активность иммунных клеток.

Гемцитабин – синтетический аналог пиримидинового нуклеотида, эффективен в лечении рака молочной железы, поджелудочной железы и лёгкого. Его фосфорилированные метаболиты ингибируют рибонуклеотидредуктазу и ДНК-полимеразу- $\alpha$ , что приводит к истощению

пула дезоксинуклеотидов, посредством чего останавливается синтез ДНК. Гемцитабин ингибирует пролиферацию В-клеток и продукцию антител в ответ на опухолевые антигены [237], что может склонить противоопухолевый иммунитет в направлении преимущественно Т-клеточного ответа [115]. Кроме того, гемцитабин снижает количество CD11b+GR1+ миелоидных супрессорных клеток [180]. Индуцированный гемцитабином апоптоз привитых опухолей в экспериментах на животных усиливает зависимость от дендритных клеток перекрёстную презентацию опухолевых антигенов Т-клеткам [209]. Согласно этим данным, гемцитабин может функционировать в синергизме со стимуляцией CD40-рецепторов Т-клеток [238]. Иммуностимулирующее действие гемцитабина было подтверждено у людей. У пациентов с раком поджелудочной железы [160], немелкоклеточным раком лёгкого [242] или раком толстой кишки [142], гемцитабин в комбинации с рекомбинантными цитокинами или вакцинами может повышать концентрацию предшественников опухольспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов и приводить к повышению частоты объективных ответов [202].

Фторурацил – флюоропиримидин (fluoropyrimidine) - обычно используется при лечении рака молочной железы и желудочно-кишечных злокачественных опухолей. *In vitro* фторурацил индуцирует экспрессию белков теплового шока (HSPs) опухолевыми клетками, а также облегчает распознавание антигенов дендритными клетками и последующую перекрёстную презентацию опухолевых антигенов [158]. Линии клеток человеческой карциномы толстой кишки, обработанные фторурацилом, приобретают способность экспрессировать CD95 и ICAM1, и становятся более чувствительными к лизису цитотоксическими Т-лимфоцитами. На мышинной модели внутриопухолевое введение дендритных клеток после системной химиотерапии, основанной на фторурациле, индуцировало Т-лимфоцит-зависимое уничтожение части опухоли, в которую были введены дендритные клетки, (и, что важно - также опухолей, находящихся в

отдалённых местах), что приводило к повышению продолжительности жизни мышей. Такой эффект может быть достигнут только в результате комбинированного лечения дендритными клетками и фторурацилом, но не достигается в результате лечения каким-либо одним из этих видов терапии в отдельности [220]. В другой модели фторурацил был также способен усиливать эффективность иммунизации пептидной вакциной, направленной против тимидилат-синтазы, его собственной молекулярной мишени [94]. Эти данные, полученные на мышах, стали предпосылкой для проведения большого рандомизированного клинического исследования на пациентах с метастатическим раком толстой кишки [202].

Ингибитор ДНК-метилтрансферазы 5-аза-деоксицитидин (DAC) используется в лечении лейкозий и миелодиспластического синдрома [227]. Считается, что антинеопластический эффект DAC включает реверсию гиперметилирования опухолюассоциированных промоторов, что ингибирует транскрипцию генов. Лечение DAC восстанавливает экспрессию молекул МНС-I и раковых тестикулярных антигенов на опухолевых клетках, делая опухолевые клетки восприимчивыми к атакам цитотоксических Т-лимфоцитов [258]. Более того, гиперметилирование опухолесупрессорного гена, кодирующего протеинкиназу, ассоциированную с апоптозом (DAPK), может быть супрессировано обработкой лейкоэмических клеток DAC, таким образом, восстанавливая IFN $\gamma$ -опосредованный сигнальный путь апоптотической гибели клеток [227]. Цитокины, индуцирующие секрецию IFN $\gamma$ , следовательно, могут быть потенциальными синергистами DAC. Действительно, комбинация IL-12 с DAC продемонстрировала большую противоопухолевую эффективность посредством усиления Т-клеточного ответа против лейкемии L1210 и меланомы B16F10 у мышей [215].

Сосудоразрушающие агенты – особая форма антиангиогенных агентов, отличающихся тем, что их действие в большей степени нацелено на преобладающие опухолевые сосуды, чем на ограничение появления новых. Известно, что флавоновые производные уксусной кислоты имеют

антивазкулярные свойства [117]. Однако было показано, что флавоноид 5,6-диметилксантенон-4-уксусная кислота (DMXAA) имеет иммунологические побочные эффекты и вызывает зависимый от IFN-I NK-клеточный ответ, а так же зависимый от CD4+-Т-лимфоцитов противоопухолевый ответ [117]. На моделях больших торакальных опухолей DMXAA способен увеличивать инфильтрацию опухолевых узлов CD11b+- и CD8+-Т-клетками, высвобождая иммуностимулирующие цитокины и хемокины (CXCL10, RANTES, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF, CCL3, CCL2, CXCL9) и индуцибельную синтазу окиси азота. Благодаря этим свойствам, DMXAA может индуцировать активацию опухолюассоциированных макрофагов, которые вносят вклад в рекрутинг других противоопухолевых эффекторов [103]. Недавно было показано, что DMXAA является новым и специфическим активатором сигнального пути TANK-связывающей киназы 1 (TBK1)–IFN-регуляторного фактора 3 (IRF3). Поэтому обработка мышинных макрофагов DMXAA приводила к сильной активации IRF3 и значимому повышению продукции матричной РНК, кодирующей IFN $\beta$  [283].

Иматиниба мезилат – клинически апробированный препарат для лечения гастроинтестинальных стромальных опухолей, которые связаны с активирующими мутациями в протоонкогене KIT или PDGFRA ( $\alpha$ -рецептор тромбоцитарного ростового фактора). Этот эффект логически объясняется тем, что иматиниба мезилат прямо воздействует на патогномичные мутации рецепторных протеин-тирозин-киназ. Тем не менее, пациенты, у которых не было мутаций в KIT или PDGFRA тоже отвечали на лечение иматиниба мезилатом [236]. Оказалось, что эти противоопухолевые эффекты были связаны с активацией NK-клеток, которая усиливалась побочным действием иматиниба мезилата на иммунные клетки [137, 236]. Действительно, иматиниба мезилат опосредует противоопухолевые эффекты, зависимые от NK-клеток, *in vivo* у мышей с опухолями, которые не отвечают на иматиниба мезилат *in vitro* [153]. Иматиниба мезилат блокирует сигналы KIT в дендритных клетках, таким образом, запуская опосредованную

дендритными клетками активацию NK-клеток и NK-зависимые противоопухолевые эффекты. У больных с гастроинтестинальными опухолями секреция NK-клетками  $IFN\gamma$ , индуцированная иматиниба мезилатом, расценивается как благоприятный прогностический критерий, что основывается на предположении о роли NK-клеток в терапевтическом действии иматиниба мезилата у человека [236]. Таким образом, в зависимости от локальных концентраций и продолжительности экспозиции иматиниба мезилата, можно ожидать как проявления ингибирующих функций иматиниба мезилата на дифференцировку дендритных клеток и T-клеток памяти, так и стимулирующего действия на NK-клетки. У мышей комбинация иматиниба мезилата и IL-2 индуцировала увеличение уникальной популяции опухолинфильтрирующих эффекторных клеток. Эти эффекторные клетки были названы IFN-продуцирующими киллерными дендритными клетками, потому что они имели фенотипические и функциональные свойства, одинаковые с миелоидными дендритными клетками и NK-лимфоцитами и могли продуцировать  $IFN\gamma$  [96]. Эти клетки могут вызывать лизис различных клеток-мишеней, вне зависимости от экспрессии МНС-молекул класса I или NKG2D-лигандов, а также повышают экспрессию МНС II класса в месте контакта с трансформированными клетками и продуцируют большие количества  $IFN\gamma$ , в противоположность классическим NK-клеткам [96]. Адоптивный перенос иммунодефицитным (Rag-/-Il2rg-/-) мышам-опухоленосителям B16F10 выявил, что эти дендритные клетки значимо ингибируют прогрессию опухоли. В совокупности эти данные свидетельствуют, что иматиниба мезилат может реализовать часть своих противоопухолевых эффектов через повышение количества и стимуляцию IFN-продуцирующих киллерных дендритных клеток [202].

Эффекты усиления иммунитета цитотоксическими соединениями, обсуждаемые выше, могут, главным образом, зависеть от способности антиген-презентирующих клеток поглощать погибающие опухолевые клетки

и затем перерабатывать и презентировать опухолевые антигены Т-клеткам памяти. Таким образом, можно ожидать, что сигналы, которые доставляются стрессированной (погибающей) опухолевой или стромальной клеткой под влиянием цитотоксических препаратов, регулируют распознавание антигена (сигналы «съешь меня»), антигенный перенос, а также процессинг и презентацию антигена, тем самым воздействуя на созревание дендритных клеток, ко-стимуляцию, их поляризацию и миграцию [202, 223] Кроме того, стрессированные опухолевые клетки могут увеличивать экспрессию стимулирующих НК-клетки лигандов (например NKGD2-лигандов после повреждения ДНК) или рецепторов смерти (к примеру - CD95 и TRAILR), таким образом повышая их восприимчивость к лизису эндогенными иммунными эффекторами [202].

Самым распространённым ответом на клеточный стресс, в том числе вызванный химиотерапией, является активация транскрипции ряда молекул шаперонов, которые принадлежат к классу индуцибельных белков теплового шока (HSPs). Такие HSPs защищают клетки от гибели путём обратной укладки поврежденных белков и при помощи направления повреждённых белков на протеасомно-опосредованную деградацию. К тому же они ингибируют апоптоз на пре- и постмитохондриальном уровнях. HSPs также могут стимулировать иммунную систему на различных уровнях. Во-первых, HSP70 и HSP90 (так же, как gp96 и кальретикулин) могут действовать на рецептор для «мусора» CD91 на поверхности дендритных клеток, тем самым передавая им сигнал на созревание [250]. HSPs могут также связывать пептиды, включая опухольспецифические антигены и направлять их по сигнальным путям МНС класса I и II для презентации Т-клеткам. Очищенные комплексы пептид-HSP могут индуцировать иммунитет против опухолей, из которых они произошли [273]. Комплексы пептид-HSP могут быть чрезвычайно эффективными в качестве источников антигенов для кросс-прайма, что было показано *in vivo* на соответствующих мышинных

моделях [125]. Кроме того, были опубликованы обнадёживающие результаты исследований HSP вакцины [144].

Во-вторых, шапероны могут играть важную роль в активации дендритных клеток в качестве сигналов «съешь меня». К примеру, HSP90 появляется на поверхности клеток миеломы человека после лечения протеасомным ингибитором бортезомибом [126] и служат в качестве сигналов активации для аутологичных дендритных клеток. Известно, что экспрессия HSP90 зависит от цитотоксического агента бортезомиба и не происходит после облучения  $\gamma$ -лучами или лечения стероидами. Это показывает, что имеются различия, зависящие от стимула в типе индуцированного ответа на стресс [202].

В-третьих, другой шаперон – кальретикулин может также быть выставлен на поверхности погибающих клеток и действовать как сигнал «съешь меня» для макрофагов, предположительно, взаимодействуя с CD91 на фагоцитирующей клетке [140]. В ответ на некоторые индукторы клеточной смерти, в частности на антрациклины и ионизирующую радиацию, кальретикулин может перемещаться из эндоплазматического ретикулума на поверхность клеток на ранней преапоптотической стадии [129, 130]. Раннее выставление кальретикулина и его скопление в отдельном фокусе на поверхности клетки (экто-кальретикулин) не является общим признаком апоптоза [202]. Когда опухолевые клетки обрабатываются антрациклинами в течение нескольких часов и затем вводятся подкожно мышам, они наиболее эффективны в индукции ответа специфичных дендритных клеток и противоопухолевых Т-лимфоцитов [134]. Экто-кальретикулин имеет ключевое значение для распознавания и поглощения погибающих опухолевых клеток дендритными клетками. Таким образом, антрациклины и  $\gamma$ -излучение, индуцирующие экто-кальретикулин, являются причиной иммуногенной смерти клеток, тогда как другие проапоптотические агенты (такие как митомицин С и этопозид) не индуцируют ни экто-кальретикулина, ни иммуногенной гибели клеток. Истощение экспрессии кальретикулина

путём трансфекции специфичными малыми интерферирующими РНК (siRNAs) отменяет иммуногенность клеточной гибели, вызываемой антрациклинами, тогда как введение экзогенного кальретикулина (как рекомбинантного протеина) или использование фармакологических препаратов, которые способствуют перемещению кальретикулина (такие как ингибиторы PP1-фосфатазы), могут повысить иммуногенность гибели клеток [126, 129]. Такие PP1-ингибиторы (например, таутомицин и каликулин А) способны повысить терапевтическую эффективность митомицина С и этопозида *in vivo*, вызывая специфичный иммунный ответ [159]. Следовательно, экспрессия кальретикулина опухолевыми клетками делает возможным прогнозирование терапевтического исхода, и в настоящее время проводятся исследования этих данных в отношении заболеваний человека [130].

То, что лечение, основанное на использовании антрациклина, облучения и оксалиплатина более эффективно в ингибировании роста привитых сингенных опухолей у иммунокомпетентных мышей, чем у бестимусных животных, указывает на способность сохранной иммунной системы повышать терапевтическую эффективность традиционного противоопухолевого лечения [287, 294]. Эти результаты побудили к проведению исследований по поиску связующего звена между врождённым и адаптивным иммунным ответом и легли в основу систематического изучения роли Toll-подобных рецепторов (TLR) в эффективности химиотерапии. Интересно, что единственным TLR, недостаточность которого снижает эффективность химиотерапии или радиотерапии *in vivo* является TLR4 и его адаптерный протеин MyD88 [287, 294]. Погибающие опухолевые клетки могут быть перекрёстно презентированы дендритными клетками наивным Т-лимфоцитам *in vitro* и *in vivo*, и стимулируют дифференцировку опухолевоспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов только тогда, когда дендритные клетки хозяина имеют функционирующий сигнальный путь TLR4–MyD88. TLR4-дефицитные дендритные клетки не способны



презентировать антигены погибающих клеток, захваченные путём фагоцитоза, несмотря на то, что у них сохранена способность к презентации растворимых белков (захваченных пиноцитозом) [287, 294], что предполагает специфический дефект в презентации антигенов после фагоцитоза. Сообщалось, что TLR4 ингибирует лизосомозависимую деградацию фагосом в макрофагах [212]. Соответственно, скорость слияния фагосом и лизосом медленнее у дикого типа дендритных клеток, чем у TLR4-дефицитных дендритных клеток, нагруженных антигенами погибающих опухолевых клеток, что может означать обусловленность дефекта TLR4 быстрой лизосомальной деградацией фагоцитированного материала. Презентация антигенов TLR4-дефицитными дендритными клетками может быть восстановлена путём ингибирования активности лизосом хлорохином (лизосомотропным основанием) или бафиломицином A1 (специфическим ингибитором вакуолярной АТФ-азы, ответственной за лизосомальное окисление). В дополнение к этому, хлорохин может отменять неблагоприятные эффекты недостаточности ответа TLR4 на химиотерапию *in vivo* [287, 294]. Дальнейшие исследования обнаружили, что лиганд TLR4, который продуцируется погибающими опухолевыми клетками, является протеином группы высокой мобильности box 1 – HMGB1 – ядерным белком, высвобождающимся из погибающих клеток на поздних стадиях апоптоза [287, 294]. Истощение HMGB1 в погибающих опухолевых клетках при помощи siRNAs или нейтрализация HMGB1 специфичными антителами аннулирует TLR4-зависимую, опосредованную дендритными клетками, презентацию антигенов погибающих опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [294]. Таким образом, высвобождение HMGB1 необходимо для иммуногенности клеточной гибели, через его воздействие на TLR4. Однако то, что ни HMGB1, ни кальретикулин (и не комбинация обоих веществ) не могут стимулировать полное созревание дендритных клеток, свидетельствует, что поиск иммуностимулирующих молекул, продуцируемых погибающими клетками, может быть продолжен. Важно, что

был найден полиморфизм в TLR4 (rs4986790), ослабляющий связывание HMGB1 с TLR4, к которому приводит единичная нуклеотидная замена (A896G) и замена одной аминокислоты (Asp299Gly) во внеклеточном домене TLR4. Соответственно, дендритные клетки, выделенные у пациентов с TLR4, несущим аллель Asp299Gly, гораздо менее эффективны в перекрёстной презентации антигенов погибающих клеток меланомы цитотоксическим Т-лимфоцитам, чем дендритные клетки пациентов с нормальным аллелем TLR4 [287, 294]. Этот недостаток был преодолен при назначении хлорохина. В ретроспективном исследовании группы из 280 больных, пролеченных по поводу рака молочной железы с метастазами в региональные лимфоузлы, придерживавшихся стандартного протокола местного хирургического, местного радиотерапевтического лечения и системной терапии антрациклинами, у пациенток с аллелем Asp299Gly TLR4 метастазы развивались быстрее, чем у больных с нормальным аллелем TLR4. Этот факт позволяет рассматривать TLR4 Asp299Gly в качестве независимого прогностического фактора раннего прогрессирования заболевания [294]. Представленные данные подтверждают концепцию о том, что селективный дефект иммунитета (в частности - опосредованной дендритными клетками презентации антигена погибающих клеток) может нарушить ответ на противоопухолевую химиотерапию [287].

Множество клинических исследований объединяет в себе традиционное противоопухолевое лечение и иммунотерапию. Некоторые из исследователей предполагают, что химиотерапия и иммунотерапия могут давать синергический эффект. Два клинических исследования, в которых вакцины из дендритных клеток были назначены до химиотерапии, показали, что у пациентов с поздними стадиями рака такой синергический ответ может быть достигнут. В одном исследовании 29 больных с терминальной стадией мелкоклеточного рака лёгкого, невосприимчивого к первой линии терапии, основывающейся на использовании препаратов платины, были включены в протокол вакцинации, предполагающий введение аутологичных

дендритных клеток, инфицированных аденовирусными векторами, кодирующими p53 [145]. Прогрессия опухоли наблюдалась у 23 пациентов, которые затем получили химиотерапию паклитакселом или карбоплатином. Уровень ответа на эту химиотерапию второй линии составил 61,5% и 38% соответственно выживаемости на первом году после вакцинации - результат, который не ожидался авторами [202]. В другом ретроспективном исследовании проанализировано влияние вакцинации нагруженными пептидами или опухолевым лизатом дендритными клетками на эффективность традиционной терапии глиобластомы. Было показано, что химиотерапия воздействует на продолжительность выживаемости больных в синергизме с предшествующей терапевтической вакцинацией. Авторы предполагают, что нацеливание иммунной системы на опухолевый антиген – тирозиназа-связанный протеин второго типа (TRP2), экспрессируемый клетками глиобластомы, повышает чувствительность к индукторам клеточной смерти [145]. Похожие синергичные эффекты были описаны при сочетании ДНК-вакцин и химиотерапии у больных с раком предстательной железы и другими опухолями на последней стадии [98, 203, 299]. Пациенты, у которых успешно был простимулирован вакциносpezifический иммунный ответ, отвечали на химиотерапию, тогда как те, у кого вакцинация была неудачной – не отвечали на химиотерапевтические воздействия. Упомянутые клинические исследования иллюстрируют, что комбинация химиотерапии и иммунотерапии может обеспечить действенную альтернативную тактику в лечении неопластического заболевания. Однако, определение подходящих доз и схем для обеспечения оптимальной синергии между двумя стратегиями, так же, как и ключевых показателей (индикаторов) и типов опухоли [164], представляются текущей задачей исследователей.

#### **1.4. Роль полиморфных вариантов генов в регуляции продукции ряда цитокинов, патогенетически важных для опухолевого процесса**

Развивающееся направление молекулярной эпидемиологии рака устанавливает, какие генетические полиморфизмы и мутации

предопределяют результат лечения у онкологических пациентов [174]. В настоящее время имеются данные о том, что некоторые полиморфные варианты генов, кодирующих TLR4, IL-10 и IL-18 могут отрицательно влиять на терапевтический ответ у больных раком молочной железы [294], лимфомой [216] и раком яичника [247], соответственно. Также показано, что некоторые полиморфизмы Fc-рецептора для IgG отрицательно влияют на эффекты терапевтических моноклональных антител [234].

Полиморфные варианты генов цитокинов могут отражаться на уровне продукции ряда цитокинов, патогенетически важных для опухолевого процесса или для иммунного ответа. Большинство авторов [31, 67, 78, 82, 210, 214] отмечают, что аллель А в полиморфизме промоторной зоны 592 С/А гена IL-10 ассоциируется с более высокой продукцией IL-10, чем аллель С. Однако, ряд зарубежных авторов [198, 217, 276] получили данные о более низкой экспрессии гена IL-10 у больных с А-аллелем в данном локусе, что может быть связано с особенностями изученных ими выборок.

Согласно данным литературы, с более высоким уровнем продукции TNF $\alpha$  ассоциировался аллель А полиморфизмов 308 G/A [31, 37, 70, 78, 80, 82, 251, 296] и 238 G/A [248] гена TNFA. В отношении полиморфизма 863С/А получены неоднозначные данные. Так, по данным Higuchi T. et al (1998) наличие 863А-аллеля было сопряжено с повышенной продукцией TNF $\alpha$  мононуклеарами периферической крови, стимулированными конканавалином А [245]. Другие исследователи ассоциировали данный генотип с низким циркулирующим уровнем цитокина [95, 293, 296, 297]. Наличие аллеля Т полиморфизмов +3954 С/Т и -31 С/Т гена IL1B ассоциировалось с более высокой продукцией IL-1 $\beta$  [32, 246], а наличие аллеля С полиморфизма 607 С/А гена другого провоспалительного цитокина, относящегося к семейству интерлейкина-1, – IL-18 было сопряжено с более высоким уровнем продукции данного цитокина, в то время, как присутствие аллеля А ассоциировалось с более низким уровнем экспрессии гена [167]. При этом с высокой продукцией IL-18 ассоциировался G-аллель

полиморфизма 137 G/C [218]. Доказано, что TNF $\alpha$  и IL-1 способны стимулировать секрецию IL-6. В свою очередь IL-6 подавляет дальнейшее образование TNF $\alpha$  и IL-1 [86, 288]. В литературе имеются сведения о сопряженности аллеля G полиморфизма 174 C/G гена IL6 с высоким уровнем продукции IL-6 [31, 60].

По данным ряда авторов [114, 282], у людей с носительством С-аллеля полиморфизма T29C гена TGFB1 ассоциирован более высокий уровень секреции антагониста провоспалительных цитокинов (TGF- $\beta$ 1), чем с наличием аллеля Т. С СС-генотипом полиморфизма TGF C509T ассоциировался, также, более высокий уровень экспрессии гена TGFB1 [93].

Данные литературы по влиянию полиморфизма -590 C/T гена IL4 на продукцию IL-4 разнятся. Если ряд авторов сообщают о сопряженности аллеля Т с более высокой экспрессией данного гена [31, 37, 67], то по данным Bozzi A. et al. (2009) с более высоким уровнем экспрессии гена IL4 связан С-аллель [213].

В литературе имеются противоречивые данные о влиянии полиморфизма 2578C/A гена VEGF (сосудистого эндотелиального фактора роста А) на уровень его экспрессии. Данное вещество стимулирует ангиогенез, в том числе в опухоли. По данным Kidd L.R. et al. (2010), аллель С был сопряжен с высокой экспрессией VEGF [109], тогда как, согласно исследованиям Koukourakis M.I. et al. (2004) с генотипом СС была сопряжена низкая экспрессия VEGF [300].

Согласованное взаимодействие белка-рецептора CCR5 и p53 обеспечивает эффективный апоптоз, а наличие мутантного варианта хемокинового рецептора CCR5 (CCR5del32) нарушает передачу апоптоз-индуцирующего сигнала трансформированным клеткам [135]. В свою очередь, выявлена прямая корреляция уровня экспрессии CCR5 с эффективностью НАХТ [58].

Обсуждается влияние полиморфных вариантов ростовых факторов, в частности, фактора роста фибробластов-2 (FGFR2), который участвует в

патогенезе рака (в том числе РМЖ). Изменение его активации возможно в результате мутации FGFR2 G/A (rs1219648) [301]. Полиморфизм рецептора к данному фактору может отражаться на уровне экспрессии данного белка или на его функциональных особенностях, что может быть причиной различной чувствительности клеток к FGF-2.

На основании концепции участия иммунной системы в противоопухолевом эффекте цитостатической терапии в течение последних лет ведутся исследования по поиску иммунологических предсказательных маркеров эффективности проведения циторедуктивного вмешательства онкологическим больным.

Предложен ряд серологических маркеров эффективности НАХТ, многие из которых относятся к иммунокомпетентным молекулам: MMP-9, тканевый ингибитор активатора плазминогена-1 (tPAI-1), IL-6, IL-8,  $\alpha$ -фетопротейн, растворимая молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа, белок-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста, MMP-3, лютеинизирующий гормон, тиреоидстимулирующий гормон, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), растворимый Fas-лиганд, фактор торможения миграции макрофагов (MIF), MMP-2, Her2/neu, CD40L, раково-эмбриональный антиген, СА 15-3, тканевый полипептидный антиген (ТПА), тканевый полипептид-специфический антиген (TPS), IL-4, адренокортикотропный гормон [265]. Однако информативность предложенных маркеров в настоящее время пока только изучается.

Обобщая приведённые выше сведения, можно утверждать, что иммунная система активно участвует в реализации противоопухолевых эффектов НАХТ, и необходимо дальнейшее изучение механизмов функционирования иммунной системы в условиях опухолевого роста и проведения цитостатической терапии с целью выявления предсказательных иммунологических критериев эффективности НАХТ.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения цели и решения задач данного исследования были использованы следующие методы: анамнестический, клинический, инструментальный, лабораторный, статистический. Обследование пациенток проводили последовательно в соответствии с разработанным планом.

#### 2.1. Организация и дизайн исследования

Исследование проведено с 2005 г. по 2009 г. на базе лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии (руководитель – д-р биол. наук, профессор Н.В. Чердынцева) и отделения общей онкологии ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН (руководитель – д-р мед. наук, профессор Е.М. Слонимская).

Дизайн исследования: открытое контролируемое сравнительное когортное исследование в параллельных группах, исследование «случай-контроль».

#### 2.2. Клиническая характеристика обследованных пациенток и описание схем их лечения

В исследование включены 269 больных раком молочной железы (РМЖ) стадии опухолевого процесса  $T_{1-4}N_{0-3}M_0$  (средний возраст  $49,3 \pm 8,6$  лет), которые были обследованы и получили лечение на базе ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН (г. Томск), и 24 практически здоровые женщины сопоставимого возраста ( $47,0 \pm 5,2$  лет) (группа контроля).

С целью отбора пациенток для исследования были разработаны критерии включения и критерии исключения.

Критерии включения в основную группу:

- 1) согласие на участие пациентки в клиническом исследовании;
- 2) гистологически подтверждённый диагноз РМЖ  $T_{1-4}N_{0-3}M_0$  стадии опухолевого процесса [24].

Критерии исключения:

- 1) наличие тяжелых эндокринных заболеваний;

- 2) наличие беременности;
- 3) острые инфекционные заболевания;
- 4) наличие обострения хронических воспалительных заболеваний;
- 5) отказ от участия в данном исследовании;
- 6) наличие признаков гематогенного метастазирования и рецидива РМЖ на этапе установления диагноза.

У всех женщин основной группы диагностировали РМЖ T<sub>1-4</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub> стадии опухолевого процесса. Пациентки были обследованы до начала проведения комплексного противоопухолевого лечения и после курса неoadьювантной химиотерапии (НАХТ). Лечение проводилось в отделении общей онкологии ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН (г. Томск). Диагноз рака молочной железы в каждом случае установлен на основании данных клинического, маммографического и ультразвукового методов обследования и верифицирован морфологически в соответствии с «Гистологической классификации опухолей молочной железы» (ВОЗ, Женева, 2003)

Эффективность НАХТ оценивалась по изменению размера опухоли в процентах от исходного по критериям ВОЗ (клинически, по данным УЗИ и маммографии) [24, 54]. В зависимости от эффективности НАХТ все больные были разделены на 4 подгруппы:

- 1) полная регрессия (первичный опухолевый узел не определяется при помощи стандартных методов диагностики);
- 2) частичная регрессия (уменьшение первичного опухолевого узла на 50% и более);
- 3) стабилизация размера опухоли (уменьшение первичного опухолевого узла менее, чем на 50% или увеличение до 25%);
- 4) прогрессирование (увеличение первичного опухолевого узла более, чем на 25% или появление новых очагов).

В первых двух ситуациях (полная и частичная регрессия опухоли) принято говорить о наличии объективного ответа на НАХТ, в случае стабилизации и прогрессирования опухолевого процесса – о его отсутствии.



Разделение всей выборки по наличию или отсутствию объективного ответа позволяет дать предварительную характеристику этим двум подгруппам больных по изучаемым параметрам. Однако гораздо большей ценностью обладают данные о пациентках с полной регрессией опухоли на фоне НАХТ. Вызывают также практический и теоретический интерес характеристики больных с прогрессированием опухолевого процесса, несмотря на применяемую НАХТ. Химиотерапевтическое лечение в данном случае оказывает лишь неблагоприятное воздействие на пациента, связанное с серьёзными побочными эффектами.

В плане комбинированного лечения всем больным проводилось 2-4 курса НАХТ.

Применяемые схемы НАХТ:

SMF – 5-фторурацил  $600 \text{ мг/м}^2$  в/в в 1-й и 8-й день, метотрексат по  $40 \text{ мг/м}^2$  в/в в 1-й и 8-й день, циклофосфан по  $100 \text{ мг/м}^2$  в/м с 1-го по 14-й день;

FAC – 5-фторурацил  $500 \text{ мг/м}^2$  в/в в 1-й и 8-й день, доксорубин  $50 \text{ мг/м}^2$  в/в в 1-й день; циклофосфан  $500 \text{ мг/м}^2$  в/в в 1-й и 8-й день;

SAF – адриамицин  $30 \text{ мг/м}^2$  в/в в 1-й и 8-й день, 5-фторурацил  $500 \text{ мг/м}^2$  в/в в 1-й и 8-й день, циклофосфан по  $100 \text{ мг/м}^2$  в/м с 1-го по 14-й день.

Собирались клиничко-морфологические данные и проводился анализ историй болезни.

Оценку показателей иммунной системы проводили до начала терапии и спустя 2 недели после НАХТ.

Оценивали основные клиничко-морфологические факторы прогноза РМЖ: возраст пациенток (до 35 лет или старше), менструальный статус (менструальный цикл сохранён, пременопауза, постменопауза), стадия (TNM), клиничко-морфологическая форма опухоли (узловая, мультицентрическая, вторичная отёчно-инфильтративная), гистологический тип опухоли (протоковый, дольковый рак), степень дифференцировки опухолевых клеток (высокая, умеренная, низкая) и рецепторный статус (экспрессия эстрогеновых, прогестероновых рецепторов и HER-2/neu на мембране

опухолевых клеток) [24]. Гистологические исследования были выполнены сотрудниками отделения патологической анатомии и цитологии, (руководитель – д-р мед. наук, профессор В.М. Перельмутер).

Сведения об особенностях анамнеза и клинического течения, схеме, объеме и эффективности проведенного лечения, сроках наступления прогрессирования заболевания получены при анализе первичной медицинской документации – историй болезни и амбулаторных карт.

Больные, которым проводилось исследование состояния иммунной системы, прошли процедуру опроса с целью выявления признаков иммунопатологических синдромов [18]. Сбор анамнеза и жалоб проводили на момент обращения пациентки. Собирались анамнез болезни, жизни, наследственный анамнез, более подробно собирались данные о предшествующих соматических заболеваниях, их частоте, выраженности и продолжительности симптомов. Социальный анамнез включал род занятий, условия быта, дополнительные нагрузки (умственные и физические). В анамнезе жизни выясняли наследственную отягощенность (наличие онкологических и гинекологических заболеваний). Также обращали внимание на наличие и частоту инфекционных заболеваний в детском и взрослом возрасте, аллергоанамнез, наличие хронических неинфекционных, в том числе аутоиммунных заболеваний. При изучении гинекологического анамнеза у женщин отмечали наличие заболеваний половых органов. На основании собранных у больных анамнестических данных выявлялось наличие или отсутствие иммунопатологических синдромов и их тип: инфекционный с недостаточностью клеточного звена иммунитета; инфекционный с недостаточностью гуморального звена иммунитета; инфекционный комбинированный; аллергический; аутоиммунный; лимфопролиферативный [18].

Все женщины были обследованы и проконсультированы онкологом, терапевтом, а также, по показаниям, были осмотрены узкими специалистами: гастроэнтерологом, гинекологом, эндокринологом и ЛОР-врачом.

Всем пациенткам проводили ультразвуковое и рентгенологическое исследование молочных желёз до лечения и в ходе НАХТ. Оценивали размер первичного опухолевого узла, состояние регионарных лимфоузлов и изменение их характеристик на фоне НАХТ. Результаты этих исследований были любезно предоставлены сотрудниками отделения лучевой диагностики (зав. отделением – д-р мед. наук, профессор И.Г. Фролова).

Контрольную группу составили 24 соматически здоровых женщины соответствующего возраста, которые были отобраны в результате комплексного клиничко-лабораторного профилактического обследования, включающего ультразвуковое исследование (УЗИ) молочных желез, на базе ЗАО «Центр Семейной Медицины» (г. Томск, директор – д-р мед. наук Черевко Н.А.).

Критерии включения в группу контроля:

- 1) согласие женщины на участие в клиническом исследовании;
- 2) отсутствие изменений в структуре молочных желез по результатам УЗИ;
- 3) отсутствие клинических и лабораторных признаков острых воспалительных процессов на момент обследования и в течение предшествующего обследованию месяца;
- 4) отсутствие хронических заболеваний.

Исключались также прививание и прием иммуностропных препаратов в течение месяца, предшествующего обследованию.

Материалом для исследования состояния иммунной системы у больных РМЖ и здоровых служила периферическая кровь, взятая утром натощак из локтевой вены.

Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с основами законодательства РФ об охране здоровья граждан (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288), было получено разрешение локального комитета по биомедицинской этике НИИ онкологии СО РАМН (протокол № 17 от 14.06.2006 г.).

## 2.3. Методы исследования

### 2.3.1. Определение фенотипа лимфоцитов периферической крови иммуноцитохимическим методом (Афримзон Е.А. и соавт., 1996)

#### *Выделение фракции мононуклеаров*

Фракцию мононуклеарных клеток получали из периферической крови по методу *Woyum* [127].

Гепаринизированную кровь (30 ед. гепарина («Биохеми», Австрия) на 1 мл крови) разводили забуференным физиологическим раствором в соотношении 1:1. Осторожно наслаивали полученную взвесь клеток на градиент плотности фиколла-верографина (1,077 г/мл) в соотношении 1:2 и центрифугировали в течение 30-40 мин при 1500 об/мин.

Градиент плотности готовили на основе сухого фикола («Loba Feinchemie», Австрия) и 76% раствора верографина (ОАО «Реактив», Россия). Осторожно собирали образовавшееся интерфазное кольцо, ресуспендировали осадок в 4-5 мл раствора Хенкса, центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин. Процесс отмывки повторяли дважды. Удалив максимально возможное количество надосадочной жидкости, полученные клетки в оставшемся объёме жидкости разводили 3% водным раствором уксусной кислоты в соотношении 1:20. Концентрацию клеток определяли в световом микроскопе в камере Горяева, считая количество мононуклеаров в 25 больших квадратах и умножая полученное число на 50, получали  $1 \times 10^6$ /мл клеток. Доводили до оптимальной концентрации клеток  $2 \times 10^6$ /мл.

#### *Постановка реакции на предметном стекле*

Полученную взвесь мононуклеаров осаждали на предметных стёклах производства ООО «БиоВитрум», (Россия) со специальным покрытием в объёме 25 мкл на лунку в течение 30-40 мин во влажной камере при комнатной температуре и фиксировали клетки в холодном ацетоне (5-7 мин). Метод основан на использовании специфичности взаимодействия «антиген – антитело» и высокой аффинности авидина по отношению к биотину. На

первом этапе происходит связывание моноклональных антител (мАТ) определенной специфичности с клеточными антигенами. Затем проводится инкубация с компонентами системы визуализации: 1) со вторыми антителами, связанными с биотином; 2) со стрептавидином, конъюгированным с ферментом (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой). Заключительным этапом является инкубация с хромогенным субстратом: DAB или Fast Red («ДАКО», Дания) в зависимости от используемого фермента). После окраски клеток ядерными красителями (гематоксилин, азур) при микроскопии идентифицируют продукт иммуноферментной реакции, образовавшийся в местах связывания выявляемых антигенов. При взаимодействии пероксидазы с DAB образуются преципитаты коричневого цвета. Fast Red в реакции с щелочной фосфатазой вызывает малиново-красное окрашивание.

Использовали моноклональные антитела против дифференцировочных и активационных антигенов CD25, CD95, CD3, CD4, CD8, CD72, HLA-DR («NovoCastra», Великобритания), CD16 («ДАКО», Дания), CD95L («BD Biosciences», США).

Учёт реакции производили с использованием световой микроскопии Axiostar Plus, («Carl Zeiss», ФРГ). При выявлении поверхностных маркеров на мембране лимфоцитов положительно окрашенной считалась клетка, по окружности которой окрашенный продукт реакции занимал не менее трети. Подсчет проводился на 200 клеток, определялся процент положительно окрашенных [77]. Количество клеток, экспрессирующих соответствующие антигены, выражали в относительных единицах (%) и абсолютных ( $\times 10^9/\text{л}$ ).

### **2.3.2. Оценка пролиферативной активности лимфоцитов**

Пролиферативная активность лимфоцитов – один из важнейших показателей активации клеток иммунной системы. Увеличение пролиферации в ответ на митогенный стимул отражает резервные возможности пула лимфоцитов к активации и осуществлению своих функций. Под влиянием поликлональных митогенов и антигенов лимфоциты

трансформируются в бластные формы, способные синтезировать ДНК и делиться. Пролиферативную активность клеток оценивали по включению в ДНК меченого тритием тимидина (Levesque, В.М. et al., 2000).

Выделенные мононуклеары периферической крови (МНПК) в количестве  $2,5 \times 10^5$  помещали в лунки 96-луночного круглодонного планшета. Наряду со спонтанным вариантом ставили пробы с митогенами для стимуляции Т-клеточного звена (ФГА, 10 мкг/мл, «Sigma», Германия) и В-звена (ЛПС, 10 мкг/мл, «Serva», Германия). Клетки инкубировали в течение 96 часов при  $t=37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . За 24 часа до окончания инкубации в кондиционные среды добавляли тимидин, меченный тритием (активность 1 мкКи/мл, «Изотоп», Россия). После инкубации культуру клеток отмывали от невключившегося  $\text{H}^3$ -тимидина и подсчитывали остаточную радиоактивность в 200 мкл толуольного сцинтиллятора, с использованием планшетного микро- $\beta$ -счетчика («Wallac», Голландия). Измеряли количество импульсов в минуту. По уровню включенной метки судили о процессе клеточной пролиферации: чем выше остаточная радиоактивность, тем больше метки включилось в ДНК, а, следовательно, тем выше пролиферативная активность [47]. Результаты представлялись абсолютными величинами (имп/мин) и индексом стимуляции, который вычислялся по формуле:  $\text{ИС} = \text{O}/\text{K}$ , где O – включение метки (число имп/мин) в культуре клеток, стимулированной ФГА или ЛПС, K – число имп/мин в культуре клеток без митогена.

### **2.3.3. Определение циркулирующих иммунных комплексов**

Иммунные комплексы в сыворотке крови определяли методом, основанном на селективной преципитации комплексов антиген-антитело в 3,7% растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ, относительная молекулярная масса 6000, фирма «Loba Chemi», Австрия), с последующим фотометрическим измерением плотности преципитата [19]. Исследуемые образцы сывороток разводили боратным буфером в соотношении 1:2. Состав буфера: 6,7 г  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 13,4 г  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  растворяли в 1000 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 8,4. смешивали

0,3 мл разведённой сыворотки с 2,7 мл боратного буфера, во второй пробирке смешивали 0,3 мл разведённой сыворотки с 2,7 мл боратного буфера, содержащего 4% ПЭГ 6000. Инкубировали 60 мин при комнатной температуре. Измерения проводили на фотоэлектроколориметре (ФЭК) в кювете 1x1 см при  $\lambda = 450$  нм. Значения светорассеяния в пробах, содержащих ПЭГ, соответствовали концентрации иммунных комплексов и выражались в условных единицах (у.е.).

#### **2.3.4. Определение растворимых факторов в сыворотке крови**

В проведенной работе исследовали концентрацию сывороточных факторов, находящихся в циркуляции, таких как иммуноглобулины классов М, А, G (IgM, IgA, IgG) и растворимые формы рецептора Fas (sAPO-1/Fas) и его лиганда FasL (sFas Ligand).

Сыворотку крови отделяли от фибринового сгустка путем центрифугирования, затем собирали в пластиковые пробирки и хранили до использования при  $t = -20^{\circ}\text{C}$ .

##### **2.3.4.1. Определение концентрации иммуноглобулинов**

Количество иммуноглобулинов М, А, G оценивали с использованием наборов производства ФГУП «НПО «Микроген» (Россия). Концентрацию сывороточных иммуноглобулинов IgG, IgM и IgA определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини (Manchini et al., 1965). В лунки, вырезанные в слое агара, в котором предварительно диспергирована моноспецифическая сыворотка, вносили по 2 мкл контрольной неразведённой сыворотки, в разведениях 1:2, 1:4, 1:8 и исследуемых сывороток. Моноспецифические сыворотки и исследуемые сыворотки разводили в веронал-мединаловом буфере с концентрацией 0,1 моль/л, рН 8,6 (веронал – 2,76 г, мединал – 17,52 г, вода дистиллированная – до 1 л). Пластины с моноспецифическими сыворотками против IgG и IgA выдерживали во влажной камере в течение 24 часов при комнатной температуре, а пластины против IgM выдерживали 48 часов. Измеряли диаметр колец преципитации. В стандартных условиях опыта диаметр кольца

преципитации прямо пропорционален концентрации исследуемого иммуноглобулина. Концентрацию иммуноглобулинов определяли относительно контрольной сыворотки крови человека с определённым содержанием в ней иммуноглобулинов. Результаты обрабатывали с помощью специальной программы и выражали в г/л.

#### **2.3.4.2. Определение концентрации растворимого Fas-рецептора**

Концентрацию растворимого Fas-рецептора определяли методом фермент-связывающего иммуносорбентного анализа с помощью тест-системы Human sAPO-1/Fas ELISA BMS245 («Bender MedSystems», Австрия).

Моноклональные Анти-sAPO-1/Fas антитела («Bender MedSystems», Австрия) были адсорбированы на микролунках.

sAPO-1/Fas, присутствовавший в образце или в стандартных образцах, адсорбировали в микролунках. Биотин-связанные моноклональные анти-sAPO-1/Fas добавляли для связывания их с sAPO-1/Fas, захваченных первым антителом.

После инкубации не связавшиеся биотин-связанные анти-sAPO-1/Fas удаляли во время отмывки. Стрептавидин добавляли для связывания его с биотин-связанным анти-sAPO-1/Fas. При последующей инкубации отсоединялся стрептавидин, который удаляли во время отмывки и растворённый субстрат, вступивший в реакцию с пероксидазой, добавляли в лунки.

Окраска продукта формировалась пропорционально количеству sAPO-1/Fas, содержащемуся в образце. Реакцию прекращали при добавлении кислоты и измеряли абсорбцию на 450 нм. Стандартную кривую строили по семи стандартным разведениям sAPO-1/Fas. Затем определяли концентрацию sAPO-1/Fas в образцах.



### **2.3.4.3. Определение концентрации растворимого Fas-лиганда**

Концентрацию растворимого FasL определяли методом фермент-связывающего иммуносорбентного анализа с помощью тест-системы Human sFas Ligand ELISA BMS260/2 («Bender MedSystems», Австрия).

sFasL, присутствовавший в образце или в стандартных образцах, адсорбировали в микролунках коммерческих планшетов, содержащих моноклональные анти-sFas-лиганд антитела. Биотин-связанные моноклональные анти-sFasL добавляли для связывания их с sFasL, захваченных первым антителом.

После инкубации не адсорбировавшиеся биотин-связанные анти-sFasL удаляли во время отмывки. Стрептавидин добавляли для связывания его с биотин-связанным анти-sFasL. При последующей инкубации отсоединялся стрептавидин, который удаляли во время отмывки и растворённый субстрат, вступивший в реакцию с пероксидазой, добавляли в лунки.

Интенсивность окрашивания формировалась пропорционально количеству sFasL, содержащемуся в образце. Реакцию прекращали при добавлении кислоты и измеряли абсорбцию на 450 нм. Стандартную кривую строили по семи стандартным разведениям sFasL. Затем определяли концентрацию sFasL в образцах.

### **2.3.5. Определение активности системы комплемента**

Активность системы комплемента в сыворотке крови определяли методом иммунного гемолиза, основанном на комплементзависимом лизисе нагруженных антителами эритроцитов барана (ЭБ) [64]. В соответствии с международным стандартом за единицу активности комплемента принимали такое его количество, которое вызывает 50% гемолиз в стандартных условиях (обозначается CH50).

#### *Приготовление гемолитической системы (сенсibilизация ЭБ)*

ЭБ трижды отмывали физиологическим раствором (центрифугировали при 1500 об/мин по 10 мин), из отмывтых эритроцитов готовили 2,5% суспензию. К 1 объёму суспензии ЭБ добавляли равный объём разведённой

гемолитической сыворотки (РАО «Биопрепарат», Россия). Тщательно перемешивали жидкости и инкубировали в течение 30 минут при 37°C.

#### *Титрование комплемента*

Разведённую 1:10 исследуемую сыворотку разливали по 4 пробиркам дозами от 0,1 мл до 0,25 мл, доводили объём в каждой пробирке до 1,5 мл физиологическим раствором. После чего в каждую пробирку добавляли по 1,5 мл сенсibilизированных ЭБ (гемолитической системы). В пробирку, где должен быть 100% гемолиз, к 1,5 мл гемолитической системы добавляли 1,5 мл дистиллированной воды. Все пробы инкубировали в течение 45 мин при 37°C. Затем центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин. Уровень гемолиза оценивали нефелометрическим методом на фотометре EL 301 («ВЮ-ТЕК instruments inc.», США). Результаты определения ОП корригировали по значению ОП контроля (пробирка с 100% гемолизом). После определения одной 50% гемолитической единицы рассчитывали число гемолитических единиц в 1 мл сыворотки по формуле:

$CH_{50}/мл = a/x$ , где  $a$  – фактор первоначального разведения сыворотки,  $x$  – объём сыворотки, вызывающий 50% гемолиз. Активность комплемента выражали в гемолитических единицах (гем. ед.)

#### **2.3.6. Определение функциональной активности нейтрофилов периферической крови в НСТ-тесте**

Функциональную активность нейтрофилов определяли по их способности генерировать активные формы кислорода (АФК) в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) [21]. Нитросиний тетразолий (НСТ) восстанавливается под действием АФК в гранулы диформаза темносинего цвета, которые локализуются в цитоплазме или на мембране нейтрофила. Оценивали спонтанную и стимулированную (при добавлении *in vitro* опсонизированного зимозана) продукцию АФК по проценту активных (формазанположительных) нейтрофилов (СПФ) и интенсивности реакции (ИРСФ), о которой судили по показателям среднего цитохимического коэффициента. Фагоцитарный резерв (ФР), отражающий

способность нейтрофилов к завершённой фагоцитозу, подсчитывали как разницу между процентными показателями, а интенсивность реакции ФР (ИРФР) рассчитывали как разницу показателей среднего цитохимического коэффициента в стимулированном и спонтанном вариантах реакции.

В стимулированном варианте НСТ-теста к 50 мкл гепаринизированной крови добавляли 25 мкл 0,2% раствора НСТ («ДиаМ», Германия) и 25 мкл опсонизированного зимозана. Для определения спонтанной продукции (АФК) вместо зимозана добавляли 25 мкл физиологического раствора. Пробы инкубировали в течение 30 мин при 37°C, периодически встряхивая. После инкубации содержимое пробирок ресуспендировали, переносили на предметные стёкла, делали толстые мазки. Окрашивали мазки 0,5% раствором сафранина («ДиаМ», Германия) и микроскопировали.

### **2.3.7. Оценка уровня секреции цитокинов в супернатантах клеточных культур мононуклеаров периферической крови**

Выделенные МНПК в количестве  $5 \times 10^5$ /мл помещали в лунки 96-луночного круглодонного планшета.

Содержание IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в супернатантах клеточных культур мононуклеаров периферической крови определяли иммуноферментным методом (ИФА). Для получения супернатантов МНПК культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2% глутамина, 80 мг/мл гентамицина («Биолот», Россия). Культивирование длилось в течение 24 часов при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> с добавлением липополисахарида (ЛПС, 10 мкг/мл, «Serva», Германия) для TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , либо фитогемагглютинаина (ФГА, 10 мкг/мл, «Sigma», Германия) для IL-2, IL-4, IL-10 и IFN- $\gamma$  (стимулированная продукция) и без митогенов для всех перечисленных цитокинов (спонтанная или базальная продукция).

Затем кондиционные среды собирали, замораживали и хранили при t=-20°C до этапа детекции.

IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 определяли с использованием тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия); IL-2 и IL-10 – с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (Россия).

Концентрацию цитокинов в кондиционных средах оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого метода используются 2 моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к исследуемому цитокину. Один тип антител иммобилизовался на внутренних поверхностях ячеек планшетов для микротитрования. Другой тип моноклональных антител к независимым эпитопам молекул IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  находился в наборах в виде конъюгата с биотином. Индикаторным компонентом являлся конъюгат пероксидазы хрена со стрептавидином, имеющим очень высокое сродство к биотину. После инкубаций и промывок в ячейки вносили конъюгат пероксидазы со стрептавидином, вновь инкубировали, промывали, вносили субстрат и измеряли активность связанной пероксидазы, используя автоматический фотометр для микропланшетов EL 301 («Bio-Tek Instruments Inc», США). Концентрацию цитокинов выражали в пг/мл.

### **2.3.8. Метод оценки апоптоза клеток периферической крови с использованием ядерного красителя Hoechst 33342**

Оценку апоптоза мононуклеарных клеток периферической крови осуществляли методом суправитального окрашивания с использованием флюоресцентного красителя Hoechst 33342 («Sigma Aldrich», США) – бисбензимида, обладающего свойством пермеабиллизации клеточной мембраны и связывающегося с тиминном или аденином ДНК [306].

Выделенные МНПК в количестве  $2 \times 10^6$ /мл осаждали на стекло в течение 30 минут во влажной камере, затем фиксировали в 70 % метаноле и замораживали, завернув в металлическую фольгу. Перед окрашиванием клетки вновь регидратировали и окрашивали красителем Hoechst 33342 (1 мкг/мл) в темноте в течение 10 мин. Препараты промывали в воде, сушили, покрывали глицеролем (1 часть глицерина к 1 части физиологического

раствора). Учет результатов проводили на люминесцентном микроскопе Axiostar Plus («Carl Zeiss», ФРГ) с насадкой HBO 50 Microscope Illuminator («Carl Zeiss», ФРГ). Светофильтр возбуждения флюоресценции  $360 \pm 5$  нм, эмиссии 490 нм. Считали не менее 200 клеток, учитывая относительное содержание клеток с четкими признаками фрагментации ядерного материала [22, 61, 111].

### **2.3.9. Методы оценки полиморфизма генов**

Геномная ДНК была выделена из лейкоцитов периферической крови стандартным методом фенол-хлороформной экстракции.

Забор венозной крови проводили в количестве 10 мл в пробирки с добавлением ЭДТА (1 мл 2,7%-го р-ра  $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ ). Центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, к осадку форменных элементов добавляли равный объём буфера, лизирующего эритроциты: 0,32 М сахарозы; 10 мМ Трис-НСl, pH 7,5; 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 1% Тритон X-100. Центрифугировали 5-10 мин при 3000 об/мин, отмывку проводили 2-3- раза.

К отмывкой лейкоmasse добавляли 1 объём буфера (0,5 М ЭДТА, 5 М NaCl, 1 М трис-НСl pH 8,0), 5% SDS до 0,5%, протеиназу К (15 мкл стокового раствора с концентрацией 10 мг/мл, «Медиген», Россия). Инкубировали 1-2 часа при  $56^\circ\text{C}$  при систематическом перемешивании содержимого пробирки. Добавляли к содержимому пробирки 5 М NaCl до 0,1 М, 1 объём фенола (перегнанного, насыщенного трис-НСl, содержащим 0,2% 8-гидроксихинолина и 0,2% 2-меркаптоэтанола, «Helicon», Россия), энергично встряхивали 15 сек, помещали в морозильную камеру ( $-20^\circ\text{C}$ ) на 30 мин, затем центрифугировали 2 мин при 12000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в чистую пробирку, добавляли смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1), встряхивали и центрифугировали 2 мин при 12000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в чистую пробирку, добавляли 1 объём хлороформа, смешанного с изоамиловым спиртом в соотношении (24:1), встряхивали и центрифугировали 2 мин при 12000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 5 М NaCl до 0,1 М, затем

добавляли 1 объём изопропилового спирта, аккуратно перемешивали до выпадения осадка. Помещали пробирки в морозильную камеру (-20°C) на 1 час. Пробы центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин. Отмывали ДНК однократно 96%-ным этиловым спиртом, 2 раза 70% этиловым спиртом. Полученный осадок подсушивали. Для приготовления аликвот осадок разбавляли 400 мкл ТЕ буфера (pH=8,0), хранили при температуре -20°C.

Анализ полиморфных вариантов специфических участков генома проводили с использованием методов полимеразной цепной реакции и анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов, используя специфическую структуру праймеров и соответствующие ферменты рестрикции (табл.1).

Однонуклеотидный полиморфизм (SNP – single nucleotide polymorphism) промоторных регионов генов IL-4 и IL-10 исследовался в позициях -590 C→T (rs 2243250) и -592 A→C (rs1800872), соответственно. Генотипирование TNFA было проведено в позициях -863 C→A (rs1800630), -308 G→A (rs1800629), -238 G→A (rs361525) его промоторного региона. Участки промоторного региона генов амплифицировали с использованием пар специфических праймеров, затем продукты амплификации подвергали гидролизу эндонуклеазами рестрикции BmeI8 для IL-4, RsaI для IL-10, Bst BAI для TNFA-863 C→A, Bsp19 I для TNFA-308 G→A и Msp I для TNFA-238 G→A. участок промоторного региона гена TNFA амплифицировали с использованием пары специфических праймеров, затем продукты амплификации подвергались гидролизу эндонуклеазами рестрикции соответственно исследуемым позициям (табл. 1). Электрофоретическое разделение продуктов рестрикции проводили в 2% агарозном геле.

Реакционная среда общим объёмом 20 мкл состояла из буфера для проведения ПЦР («Сибэнзим», Россия), включающего в себя следующие реагенты: 60 mM Трис-НСl (pH 8,5); 25 mM КСl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM 0,1% меркаптоэтанола; Triton X-100; а также 30 пкмоль каждого

олигонуклеотида; 125 мМ каждого dNTP («Сибэнзим», Россия); 50-200 нг геномной ДНК и 1-2 ед. Taq полимеразы («Сибэнзим», Россия).

Таблица 1

**Структура праймеров и ферменты рестрикции для анализа  
полиморфных вариантов генов цитокинов**

Ген	Полиморфизм	Структура праймера	Температура отжига	Фермент рестрикции
IL-4	C-590T	5'-actaggcctcacctgatacg-3' 5'-gttgtaatgcagtcctcctg-3'	57	Bsm FI
IL-10	C-592A	5'-atccaagacaacactactaa-3' 5'-taaataatcctcaaagtcc-3'	54	Rsa I
TNFA	A-308G A-308G A-308G	5'-agg-caa-tag-gtt-ttg-agg-acc-at-3' 5'-aca-ctc-ccc-atc-ctc-ccg-gct-3'	57	Bsp19I BstBAI Msp I

Программа амплификации включала стандартно предварительную денатурацию при 94°C в течение 5 мин, с последующими 30-35 циклами отжига при специфической для каждой пары праймеров температуре (1 мин), элонгации цепи при 72°C (1 мин) и денатурации при 94°C (1 мин). Программу завершала финальная элонгация при 72°C в течение 5 мин.

Для разделения фрагментов ДНК использовали 2%-ный агарозный гель. Продукты амплификации подвергали рестрикции соответствующими эндонуклеазами (табл. 1). Продукты рестрикции разделяли с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле, содержащем 0,5 мг/мл этидиум бромида при напряжении 120-130В в течение 30-45 мин и визуализировали в УФ-свете. В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду pUC19, расщеплённую рестриктазой MspI («Сибэнзим», Россия).

Детекцию полиморфных вариантов гена IL-1β проводили, используя ПДРФ-анализ. Последовательности олигонуклеотидных праймеров для ПЦР и размеры фрагментов представлены в табл. 2.

ПЦР проводилась в объёме 20 мкл в буфере (60мМ трис-HCl, 25 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 1 мМ ДТТ), содержащем 0,25 мМ dNTP, 0,5 мМ праймеров, ~0,2 нг ДНК-матрицы и 2,0 ед. акт. Taq-

полимеразы. ПЦР проводилась на амплификаторе «PTC-200 DNA Engine» («MJ Research», США) при следующем температурном режиме:

Начальная денатурация – 95°C 3 мин

2 – 30 цикл:

денатурация – 95°C 20 сек;

отжиг праймеров – 20 сек при 57 - 65°C – для разных праймеров

элонгация – 30 сек при 72°C.

Гидролиз продуктов ПЦР проводили в буфере, соответствующем выбранной эндонуклеазе рестрикции (табл. 2). В реакционную смесь добавляли 2-10 ед. акт. фермента на 1 мкг ДНК и инкубировали при оптимальной для данной эндонуклеазы рестрикции температуре в течение 2-4 часов. Полноту прохождения гидролиза контролировали по сайтам внутреннего контроля.

**Таблица 2**

**Структура праймеров, ферменты и продукты рестрикции для анализа полиморфных вариантов генов цитокинов**

Ген	Полиморфизм	Праймеры	Продукт ПЦР	Рестрик таза	Продукты рестрикции
IL1B	-31C/T (rs1143627)	F: agaagcttcaccaatact R: agcacctagttgtaaggaag	239 п.н.	AluI	T: 136,97,6 п.н. C: 233,6 п.н.
	+3954C/T (rs1143634)	F: ctcaggtgtcctcgaagaaatcaaa R: gcttttttgctgtgagtgccg	194 п.н.	TaqI	C: 95,85,14 п.н. T: 180,14 п.н.

Примечание: F – прямой праймер; R – обратный праймер.

Электрофорез проводили в 2% агарозных и 5% акриламидных гелях. Детекция фрагментов ДНК и анализ результатов выполнялись с помощью видеоденситометра и программного обеспечения «ImageMaster®VDS» (Pharmacia Biotech, США).

**2.4. Статистические методы оценки полученных результатов**

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета прикладных программ STATISTICA for Windows 6.0 (StatSoft Inc., США). Количественные данные представлены в



виде  $X \pm \sigma$ , где  $X$  – среднее значение;  $\sigma$  – стандартное отклонение среднего, а также в виде  $(M; 25\%Q-75\%Q)$ , где  $M$  – медиана, а  $25\%Q-75\%Q$  – интерквартильный разброс.

Проверку достоверности различий производили с использованием непараметрических критериев, в силу наличия выборок малого объема. Достоверность различий проверяли при помощи U-критерия Манна – Уитни (сравнения попарно независимых групп данных), W-критерия Вилкоксона (сравнения попарно связанных групп данных при исследовании изменения показателя внутри группы), теста Фишера и критерия  $\chi^2$  Пирсона для сравнения частотных характеристик качественных и ранговых признаков. Для оценки силы ассоциации генотипов с эффективностью НАХТ рассчитывали значение критерия отношения шансов (OR). Для интегральной оценки взаимосвязи параметров иммунного статуса пациенток с различной степенью эффективности НАХТ проводили корреляционный анализ по Спирмену. Использовали регрессионный анализ. Обсуждаются результаты с достоверностью различий при  $p < 0,05$  и с тенденцией различий при  $0,05 < p < 0,1$  [13, 44, 63, 189].

## ГЛАВА 3

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Особенности функционирования иммунной системы до начала лечения у больных РМЖ с различной эффективностью НАХТ

Для выявления взаимозависимости между компонентами иммунного статуса и эффективностью НАХТ проводилась многоэтапная статистическая обработка данных. Параметры иммунного статуса оценивались как до, так и после НАХТ во всей когорте больных.

Особенности иммунного статуса, присущие больным РМЖ, выявило сравнение иммунологических показателей когорты пациенток с группой здоровых доноров (ЗД). Дальнейший анализ по подгруппам в зависимости от эффективности НАХТ позволил выделить показатели иммунного статуса, которые были сопряжены с тем или иным вариантом изменения размера опухоли под действием цитостатических препаратов. Иммунный статус больных в дальнейшем был также оценён с учётом наличия ИПС и морфологических характеристик опухоли, для которых была выявлена сопряжённость с эффективностью НАХТ.

Оценивая состояние иммунной системы больных РМЖ, обследованных до начала лечения, и здоровых женщин, на фоне опухолевого процесса мы выявили статистически подтверждённые высокие уровни значений следующих показателей: относительное и абсолютное количество CD72<sup>+</sup>- и CD95<sup>+</sup>-клеток, абсолютное содержание CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов, концентрация IgG, спонтанная секреция TNF- $\alpha$ , ФР и ИРФР, а также процент МНПК с морфологическими признаками апоптоза (табл. 3). При этом целый ряд параметров характеризовался сниженными по отношению к уровню здоровых значениями: относительное количество CD3<sup>+</sup>-клеток, концентрация IgM, стимулированная ФГА пролиферативная активность лимфоцитов, ИС пролиферативной активности под влиянием ФГА, спонтанная и стимулированная ФГА продукция IL-4 (табл. 3).

**Иммунологические показатели больных РМЖ (до лечения) и  
здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Показатели иммунного статуса	Больные РМЖ (n=131)	Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)
1	2	3	4
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	5,80 (4,80; 7,50)	5,40 (4,20; 6,40)	0,10
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,50 (0,00; 2,00)	1,00 (0,00; 3,00)	0,66
Сегментоядерные нейтрофилы, %	62,00 (58,00; 68,00)	58,00 (51,00; 67,00)	0,11
Эозинофилы, %	2,00 (1,00; 3,00)	3,00 (1,00; 4,00)	0,38
Базофилы, %	0,00 (0,00; 2,00)	0,00 (0,00; 1,00)	0,96
Моноциты, %	6,00 (5,00; 8,00)	6,00 (4,00; 8,00)	0,85
Лимфоциты, %	29,50 (24,00; 33,00)	24,00(21,00;36,00)	0,29
<b>CD3<sup>+</sup>-лимфоциты, %</b>	<b>51,50 (43,00; 59,00)</b>	<b>56,00(53,00;59,00)*</b>	<b>0,02</b>
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	30,00 (19,00; 40,00)	38,00(24,00;45,00)	0,22
CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	24,50 (19,00; 30,00)	22,00(19,00;32,00)	0,97
CD16 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	15,00 (9,00; 22,00)	12,00(10,00;16,00)	0,17
<b>CD72<sup>+</sup>-лимфоциты, %</b>	<b>17,00 (14,00; 23,50)</b>	<b>11,00(10,00;15,00)*</b>	<b>0,003</b>
CD25 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	15,00 (9,00; 22,00)	13,00 (8,00; 16,00)	0,21
<b>CD95<sup>+</sup>-лимфоциты, %</b>	<b>13,00 (8,00; 21,00)</b>	<b>9,00 (7,00; 11,00)*</b>	<b>0,01</b>
CD95L <sup>+</sup> -лимфоциты, %	21,00 (11,00; 37,00)	17,00(12,00;21,00)	0,22
HLA-DR <sup>+</sup> -лимфоциты, %	30,50 (23,00; 39,00)	29,00(25,00;34,00)	0,56
<b>Лимфоциты, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	<b>1,66 (1,34; 2,33)</b>	<b>1,40 (0,76; 1,87)*</b>	<b>0,054</b>
CD3 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,85 (0,64; 1,17)	0,78 (0,41; 1,02)	0,23
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,47 (0,28; 0,71)	0,47 (0,22; 0,61)	0,55
<b>CD8<sup>+</sup>-лимфоциты, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	<b>0,41 (0,26; 0,59)</b>	<b>0,30 (0,15; 0,51)*</b>	<b>0,09</b>
CD4/CD8	1,19 (0,77; 1,57)	1,19 (1,07; 1,46)	0,45
<b>CD16<sup>+</sup>-лимфоциты, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	<b>0,26 (0,15; 0,38)</b>	<b>0,14 (0,08; 0,29)*</b>	<b>0,057</b>
<b>CD72<sup>+</sup>-лимфоциты, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	<b>0,28 (0,19; 0,44)</b>	<b>0,13 (0,07; 0,26)*</b>	<b>0,001</b>
<b>CD25<sup>+</sup>-лимфоциты, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	<b>0,24 (0,12; 0,45)</b>	<b>0,14 (0,09; 0,25)*</b>	<b>0,048</b>
<b>CD95<sup>+</sup>-лимфоциты, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	<b>0,22 (0,13; 0,36)</b>	<b>0,11 (0,07; 0,20)*</b>	<b>0,003</b>
<b>IgM, г/л</b>	<b>1,80 (1,34; 2,50)</b>	<b>2,30 (1,70; 3,10)*</b>	<b>0,04</b>
<b>IgG, г/л</b>	<b>15,60 (11,70; 20,20)</b>	<b>12,40 (9,50; 16,55)*</b>	<b>0,03</b>
IgA, г/л	2,50 (1,70; 3,20)	2,25 (1,80; 3,60)	0,84
ЦИК, у.е.	70,00 (50,00; 100,00)	60,00 (35,00; 75,00)	0,07
Комплемент, гем.ед.	81,60 (66,60; 105,90)	42,25 (42,25; 42,25)	1,00
Пролиф. сп., имп/мин	2868,00 (1654,00; 4482,00)	3051,00 (1631,00; 4457,00)	0,84
<b>Пролиф. ФГА, имп/мин</b>	<b>19112,00 (7763,00; 42502,00)</b>	<b>31837,00 (22023,00; 57041,00)*</b>	<b>0,01</b>
Пролиф. ЛПС, имп/мин	3290,00 (1657,00; 6505,00)	2869,00 (2057,00; 4458,00)	0,67

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
<b>ИС ФГА, у.е.</b>	<b>6,60 (2,34; 13,51)</b>	<b>13,87 (8,63; 16,88)*</b>	<b>0,009</b>
ИС ЛПС, у.е.	1,17 (0,77; 1,94)	0,91 (0,81; 1,72)	0,50
<b>ФР, %</b>	<b>36,00 (20,00; 54,50)</b>	<b>17,00 (8,00; 29,50)*</b>	<b>0,001</b>
<b>ИРФР, у.е.</b>	<b>57,50 (28,00; 89,00)</b>	<b>23,50 (12,00; 45,50)*</b>	<b>0,004</b>
СПФ, %	5,00 (3,00; 13,00)	7,00 (4,00; 9,00)	0,60
ИРСПФ, у.е.	5,50 (3,00; 13,50)	7,00 (4,00; 10,50)	0,51
<b>TNF-<math>\alpha</math><sub>сп</sub>, пг/мл</b>	<b>110,00 (32,00; 440,20)</b>	<b>15,65 (1,70; 52,00)*</b>	<b>0,0003</b>
TNF- $\alpha$ <sub>ст</sub> , пг/мл	589,00 (162,00; 1702,00)	322,00 (94,00; 772,00)	0,13
IL-1 <sub>сп</sub> , пг/мл	290,00 (119,50; 1320,00)	344,50 (146,00; 1224,00)	0,98
IL-1 <sub>ст</sub> , пг/мл	1666,50 (703,00; 4114,00)	1716,00 (436,00; 3598,00)	0,79
IFN- $\gamma$ <sub>сп</sub> , пг/мл	140,00 (22,50; 295,00)	82,75 (23,00; 138,75)	0,13
IFN- $\gamma$ <sub>ст</sub> , пг/мл	302,50 (137,50; 856,00)	598,00 (375,00; 3500,00)	0,056
IL-2 <sub>сп</sub> , пг/мл	9,20 (0,00; 29,60)	9,30 (0,00; 14,10)	0,59
IL-2 <sub>ст</sub> , пг/мл	11,05 (0,00; 31,10)	27,90 (0,00; 55,80)	0,33
IL-10 <sub>сп</sub> , пг/мл	24,60 (3,40; 149,70)	20,40 (4,80; 54,90)	0,55
IL-10 <sub>ст</sub> , пг/мл	49,65 (12,50; 252,60)	47,10 (14,20; 245,80)	0,87
<b>IL-4<sub>сп</sub>, пг/мл</b>	<b>6,90 (0,00; 16,20)</b>	<b>12,20 (9,90; 14,30)*</b>	<b>0,02</b>
<b>IL-4<sub>ст</sub>, пг/мл</b>	<b>7,20 (0,00; 18,40)</b>	<b>13,30 (12,40; 16,00)*</b>	<b>0,02</b>
<b>Относительное содержание МНПК с признаками апоптоза в ПК, %</b>	<b>30,00 (22,00; 40,00)</b>	<b>12,00 (8,00; 16,00)*</b>	<b>&lt;0,001</b>
sFas, нг/мл	28,95 (24,00; 42,20)	36,20 (30,25; 40,95)	0,22
sFasL, нг/мл	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,70

Примечание: здесь и далее в табл. 4-12 : n – количество обследованных; p – уровень значимости различий; \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05); ФГА – фитогемагглютинин; ЛПС – липополисахарид; ИС – индекс стимуляции пролиферативной активности.

Оценка исходного уровня (до начала НАХТ) параметров иммунного статуса в 4 подгруппах пациенток, сформированных с учетом ответа опухоли на предоперационную терапию, выявила ряд особенностей функционирования иммунной системы на фоне опухолевого роста в сравнении с показателями ЗД и между подгруппами (табл. 4-11). Следует отметить, что по таким параметрам, как общее количество лейкоцитов и показатели гемограммы подгруппы пациентов не различались между собой и со здоровыми донорами (табл. 4).

**Показатели гемограммы у больных РМЖ до лечения и у здоровых доноров (Ме[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Абсолютное и относительное количество лейкоцитов в ПК	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4	5			
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	5,40 (4,35; 6,85)	5,90 (4,60; 8,15)	5,80 (4,95; 7,30)	5,90 (5,00; 6,80)	5,40 (4,20; 6,40)	0,38	0,53	0,36
Палочко-ядерные нейтрофилы, %	2,00 (2,00; 2,00)	2,00 (1,00; 2,00)	1,50 (0,00; 3,00)	0,00 (0,00; 0,00)	1,00 (0,00; 3,00)	1,00	1,00	1,00
Сегментоядерные нейтрофилы, %	62,50 (58,50; 67,00)	62,00 (55,00; 68,00)	61,50 (58,00; 70,00)	64,00 (59,00; 65,00)	58,00 (51,00; 67,00)	0,93	0,92	0,91
Эозинофилы, %	4,00 (4,00; 4,00)	3,00 (2,00; 3,00)	2,00 (1,00; 2,00)	1,00 (0,00; 2,00)	3,00 (1,00; 4,00)	1,00	1,00	1,00
Базофилы, %	1,00 (1,00; 1,00)	0,00 (0,00; 0,00)	1,00 (0,00; 2,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 1,00)	1,00	1,00	1,00
Моноциты, %	4,50 (4,00; 6,50)	6,00 (5,00; 9,50)	7,00 (6,00; 8,00)	6,00 (4,00; 7,00)	6,00 (4,00; 8,00)	0,44	0,16	0,67

Результаты оценки субпопуляционного состава лимфоцитов (табл. 5) показали, что у больных с полной, частичной регрессией и стабилизацией опухолевого процесса относительное количество CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов было ниже контрольного. При этом данный показатель был значимо ниже контроля как у больных с наличием, так и с отсутствием объективного ответа на НАХТ.

Больные со стабилизацией опухоли продемонстрировали более высокое абсолютное содержание в крови CD16<sup>+</sup>-клеток в сравнении показателями здоровых доноров ( $p < 0,05$ ), а у пациенток с прогрессированием опухолевого процесса были отмечены значимо более высокие показатели абсолютного и относительного количества клеток данной субпопуляции в сравнении с контролем (табл. 5). Абсолютное количество CD16<sup>+</sup>-клеток у

больных с отсутствием объективного ответа (0,29 [0,18; 0,48]) было значимо выше в сравнении с показателем пациенток с наличием объективного ответа на НАХТ (0,22 [0,11; 0,32]) и здоровых доноров (0,14 [;0,08;0,29]).

Связь субпопуляции естественных киллеров (CD16+) с прогнозом течения РМЖ была выявлена Levy S. в 1987 г. [147]. Считается, что НК способны целенаправленно уничтожать опухолевые клетки, не повреждая при этом здоровые клетки, путём инициации апоптоза [1, 2, 3, 72, 119]. Однако в нашем исследовании высокое содержание CD16+-субпопуляции лимфоцитов до проведения НАХТ ассоциировалось с последующей неэффективностью химиотерапии. В литературе имеются данные об ингибировании противоопухолевого иммунитета на фоне активации НК-клеток, которая приводит к массивному выбросу IL-13 и связанной с ним индукцией синтеза супрессорного цитокина TGF- $\beta$  [97, 199]. Высказываются предложения использовать этот показатель в качестве одного из критериев для оценки прогноза течения онкозаболеваний и эффективности противоопухолевой терапии [69]. При этом многие авторы указывают на более низкий, в сравнении со здоровыми, уровень НК у онкологических больных [42], однако в настоящем исследовании этого не наблюдалось ни в одной из сформированных нами групп больных РМЖ.

Данные о более высоком содержании В-лимфоцитов в циркулирующей крови онкологических больных описаны в литературе [35] и подтверждаются в нашем исследовании. Абсолютное количество CD72+-лимфоцитов было выше контрольного у всех пациенток, а относительное количество CD72+-клеток значимо превышало показатель здоровых доноров во всех подгруппах больных, за исключением пациенток с частичной регрессией, у которых выявлена тенденция к повышению численности клеток данной субпопуляции ( $p=0,096$ ) (табл. 5). При этом относительное количество клеток данной субпопуляции было значимо выше у больных без объективного ответа в сравнении с показателем пациенток с объективным ответом на НАХТ (18,00 [15,00; 28,00] и 16,00 [12,00; 19,00], соответственно).

Таблица 5

**Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови  
у больных РМЖ до лечения и у здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Относительное и абсолютное содержание лимфоцитов в ПК	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4	5			
Лимфоциты, %	33,00(24,00;37,00)	30,00(24,00;34,00)	28,50(24,00;33,00)	29,00(23,00;31,00)	24,00(21,00;36,00)	0,44	0,32	0,18
CD3, %	<b>46,00(43,00;56,00)*</b>	<b>51,00(41,00;60,00)*</b>	<b>52,00(45,00;57,00)*</b>	49,00(43,00;63,00)	56,00(53,00;59,00)	0,66	0,58	0,59
CD4, %	29,00 (19,00;30,00)	29,00 (19,00;39,00)	30,00 (19,00;41,00)	30,00(20,00;48,00)	38,00(24,00;45,00)	0,41	0,25	0,30
CD8, %	26,00 (25,00;38,00)	24,00 (19,00;30,00)	23,00 (17,00;30,00)	31,00(20,00;35,00)	22,00(19,00;32,00)	0,13	0,12	0,76
CD16, %	10,00(9,00;14,00)	14,00(7,00;21,00)	16,00(10,00;22,00)	<b>19,00(18,00;23,00)*</b>	12,00(10,00;16,00)	0,66	0,31	0,15
CD72, %	<b>16,10(14,00;25,00)*</b>	16,00 (11,00;19,00)	<b>18,00(15,00;23,00)*</b>	<b>28,00(15,00;30,00)*</b>	11,00(10,00;15,00)	0,31	0,73	0,37
CD25, %	17,00 (10,70;22,00)	14,00 (7,00;20,00)	15,50 (9,00;23,00)	14,00 (10,00;24,00)	13,00 (8,00;16,00)	0,39	0,81	0,97
HLA-DR, %	30,00 (27,00;39,00)	26,00 (21,00;37,00)	<b>36,00(25,50;42,50)*</b>	24,00 (22,00;34,00)	29,00(25,00;34,00)	0,13	0,72	0,15
Лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	1,68 (1,49;2,43)	1,74 (1,29;2,30)	1,63 (1,35;2,25)	1,47 (1,39;2,23)	1,40 (0,76;1,87)	0,75	0,69	0,49
CD3, *10 <sup>9</sup> /л	0,89 (0,64;1,39)	0,88 (0,58;1,19)	0,80 (0,62;1,18)	0,73 (0,66;1,02)	0,78 (0,41;1,02)	0,72	0,69	0,87
CD4, x10 <sup>9</sup> /л	0,47 (0,28;0,67)	0,38 (0,24;0,67)	0,56 (0,32;0,81)	0,47 (0,43;0,78)	0,47 (0,22;0,61)	0,70	0,60	0,43
CD8, x10 <sup>9</sup> /л	0,50 (0,24;0,77)	0,41 (0,26;0,56)	0,40 (0,26;0,55)	0,46 (0,31;0,62)	0,30 (0,15;0,51)	0,49	0,55	0,96
CD4/CD8	<b>0,87(0,76;0,94)*</b>	1,32 (0,77;1,77)	1,16 (0,86;1,43)	1,12 (0,68;1,63)	1,19 (1,07;1,46)	0,11	0,096	0,36
CD16, x10 <sup>9</sup> /л	0,21 (0,12;0,52)	0,22 (0,10;0,31)	<b>0,29 (0,18;0,43) *</b>	<b>0,29 (0,26;0,49) *</b>	0,14 (0,08;0,29)	0,65	0,47	0,37
CD72, x10 <sup>9</sup> /л	<b>0,39(0,33;0,42)*</b>	<b>0,26(0,17;0,37)*</b>	<b>0,29 (0,20;0,47) *</b>	<b>0,39 (0,20;0,48) *</b>	0,13 (0,07;0,26)	0,06	0,39	0,87
CD25, x10 <sup>9</sup> /л	<b>0,34(0,24;0,51)*</b>	0,18 (0,10;0,44)	<b>0,30 (0,14;0,49) *</b>	0,24 (0,14;0,32)	0,14 (0,09;0,25)	0,16	0,58	0,19

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05).

Абсолютное количество CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов у больных с полной регрессией и со стабилизацией опухолевого процесса (табл. 5), а также у больных, входящих в группу с отсутствием объективного ответа на НАХТ (0,27 [0,14; 0,45]), было значимо выше контроля.

Относительное количество HLA-DR-положительных клеток у пациенток со стабилизацией опухоли было повышено относительно контрольных значений (табл. 5).

Значение иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) было значимо ниже у больных с полной регрессией по отношению к уровню этого показателя у здоровых доноров (табл.5). Низкое значение соотношения CD4/CD8, в сравнении с показателем здоровых доноров, у больных с полной регрессией первичной опухоли до НАХТ, при отсутствии отличий этого показателя от контрольного уровня в других подгруппах больных, может свидетельствовать о смещении баланса Т-лимфоцитов в сторону увеличения численности Т-цитотоксических клеток (CD8<sup>+</sup>). CD8<sup>+</sup>-лимфоциты являются основными эффекторами специфического противоопухолевого иммунитета. Преобладание данной субпопуляции Т-клеток в циркулирующем пуле, возможно, вносит вклад в реализацию полной регрессии опухоли в результате НАХТ.

Концентрация сывороточного IgM у больных с частичной регрессией и прогрессирующим опухолем была значимо ниже уровня этого показателя у здоровых доноров (табл. 6). У больных с наличием объективного ответа данный показатель также был значимо ниже контрольного (1,7 [1,4; 2,3] и 2,30 [1,70; 3,10], соответственно).



**Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови  
у больных РМЖ до лечения и у здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4				
Ig M, г/л	1,70 (1,60; 2,70)	<b>1,70</b> <b>(1,40; 2,30) *</b>	2,00 (1,30; 2,65)	<b>1,70</b> <b>(1,10; 2,40) *</b>	2,30 (1,70; 3,10)	0,50	0,95	0,33
IgG, г/л	<b>21,00</b> <b>(17,10; 25,60)*</b>	13,90 (10,70; 19,00)	16,10 (12,30; 20,40)	13,25 (9,80; 17,10)	12,40 (9,50; 16,55)	<b>0,01</b>	0,05	<b>0,02</b>
Ig A, г/л	2,60 (2,20; 4,00)	2,50 (1,70; 3,20)	2,60 (2,00; 3,00)	2,10 (1,50; 2,90)	2,25 (1,80; 3,60)	0,23	0,42	0,11

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05).

Мы не можем утверждать, что активация В-клеточного звена у больных РМЖ связана с участием В-лимфоцитов в противоопухолевых иммунных реакциях, однако вероятность этого не исключена. Данные о роли противоопухолевых антител в протективном противоопухолевом иммунитете весьма противоречивы. Так, по результатам некоторых экспериментальных исследований, накапливающиеся противоопухолевые антитела конкурировали с цитотоксическими Т-лимфоцитами. Например, О.В. Прусаковой с соавт. (2005) был получен препарат FasFc, состоящий из экстраклеточной части Fas-рецептора и Fc-фрагмента IgG. При добавлении к клеткам FasFc не проявлял заметной цитотоксичности, однако сшивка FasFc с помощью анти-Fc-антител вызывала гибель клеток [84]. По некоторым данным, активность гуморального звена иммунитета остаётся нормальной и достаточно долго вообще не зависит от степени опухолевой прогрессии [66, 119].

В литературе имеются сообщения и о том, что нормальная активность гуморальной составляющей иммунитета оказывается фактором,

способствующим прогрессированию злокачественного новообразования. По мнению некоторых авторов, противоопухолевые антитела не только не обладают протективными свойствами, но и способны экранировать опухолевые клетки от действия эффекторов клеточного иммунитета [119].

В нашем же исследовании концентрация в сыворотке IgG у больных с полной регрессией значимо превышала показатели, зарегистрированные у больных с частичной регрессией и прогрессированием опухолевого процесса, а также содержание данного иммуноглобулина в крови здоровых доноров (табл. 6). При этом средневыворочное значение концентрации данного изоформа иммуноглобулинов было выше допустимых нормативных значений: 21,00 (17,10;25,60) г/л при популяционной норме не выше 18 г/л. Примечательно, что медиана концентрации IgG у больных с наличием объективного ответа на НАХТ также превышала контрольные значения, однако это не подтверждалось статистически ( $p=0,07$ ). Таким образом, высокое содержание IgG в сыворотке было сопряжено с полной регрессией опухоли после НАХТ. Значительно более высокий уровень продукции высокоаффинного IgG у больных с полной регрессией, в противоположность близким к норме уровням данного иммуноглобулина во всех других группах больных РМЖ, может свидетельствовать о возможном вкладе высокоспецифичного гуморального иммунного ответа (в том числе, противоопухолевого) в реализацию эффекта НАХТ и/или о наличии у больных с полной регрессией опухоли воспалительных процессов (с активацией В-клеточных иммунных реакций) на момент обследования, или о «провоспалительной настроенности» иммунной системы вообще.

Значимых различий в содержании IgA у больных РМЖ с разной эффективностью НАХТ выявлено не было (табл. 6).

Уровень ЦИК в сыворотке крови был повышен у больных с частичной регрессией опухоли в сравнении со значениями здоровых доноров (табл. 7).

**Содержание ЦИК и активность комплемента в сыворотке крови у  
больных РМЖ до лечения и у здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Показатели	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4				
ЦИК, у.е.	50,00 (35,00; 70,00)	<b>80,00</b> <b>(50,00;</b> <b>100,00) *</b>	70,00 (50,00; 90,00)	60,00 (40,00; 100,00)	60,00 (35,00; 75,00)	0,13	0,19	0,59
Комплемент, гем.ед.	74,70 (66,00; 117,90)	82,90 (67,00; 100,00)	75,80 (66,00; 113,50)	104,10 (75,80; 108,40)	42,25 (42,25; 42,25)	0,60	0,78	0,60

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05).

Оценка спонтанной пролиферативной активности лимфоцитов статистически значимой разницы между подгруппами больных и здоровых доноров не выявила (табл. 8). Уровень стимулированной ФГА пролиферации лимфоцитов был значимо ниже контроля во всех подгруппах больных, за исключением больных с полной регрессией (табл. 8). При этом данный показатель был достоверно снижен по отношению к группе контроля у больных с наличием (20503,00 [7715,00;44920,00]) и отсутствием (17991,50 [7824,00;41375,25]) объективного ответа на НАХТ.

Индекс стимуляции пролиферативной активности лимфоцитов под влиянием ФГА был значимо ниже, в сравнении с показателями здоровых доноров, у всех больных, кроме пациенток с частичной регрессией опухоли после НАХТ (табл. 8). Следует отметить, что данный показатель у больных без объективного ответа на НАХТ также был достоверно снижен (6,07 [2,23;10,29]) в сравнении с контрольной группой (13,87 [8,63;16,88]). Таким образом, при анализе данного показателя подтвердилась связь объективного ответа на НАХТ с сохранностью пролиферативного потенциала Т-лимфоцитов на уровне, близком к контрольному. Различия между значениями, характеризующими ЛПС-стимулированную пролиферацию

лимфоцитов, и соответствующими значениями индекса стимуляции у больных и в группе контроля были статистически не значимы (табл. 8).

Известно, что стимуляция ФГА способствует пролиферации Т-лимфоцитов, тогда как воздействие ЛПС индуцирует пролиферативный ответ В-лимфоцитов. Полученные нами результаты подтверждают данные литературы о том, что функциональная активность Т-звена играет важную роль в противоопухолевом эффекте НАХТ. Как уже неоднократно упоминалось ранее, Т-звено считается ведущим в развитии антиген-специфического противоопухолевого иммунитета.

Таблица 8

**Спонтанная, стимулированная ФГА и ЛПС пролиферативная  
активность мононуклеаров периферической крови у больных РМЖ до  
лечения и у здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Пролиферативная активность МНПК	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4				
Спонтанная, имп/мин	3370,50 (2510,80; 5143,50)	2306,25 (1305,00; 3609,00)	2878,50 (1827,00; 6202,50)	4005,00 (2855,00; 4875,00)	3051,00 (1631,00; 4457,00)	0,13	0,71	0,72
Стимулированная ФГА, имп/мин	27808,50 (8979,50; 42456,00)	<b>19713,50</b> <b>(7715,00;</b> <b>50890,0) *</b>	<b>19232,50</b> <b>(7885,00;</b> <b>42502,0) *</b>	<b>11536,00</b> <b>(7763,00;</b> <b>40138,0) *</b>	31837,00 (22023,0; 57041,00)	0,98	0,79	0,59
Стимулированная ЛПС, имп/мин	4296,00 (2639,50; 7403,50)	2548,50 (1437,00; 6156,00)	3374,00 (2452,00; 7023,00)	4218,50 (1527,00; 4575,00)	2869,00 (2057,00; 4458,00)	0,24	0,81	0,59
ИС ФГА, у.е.	<b>9,43</b> <b>(1,67;</b> <b>11,51) *</b>	9,67 (2,37; 21,64)	<b>6,07</b> <b>(2,12;</b> <b>10,64) *</b>	<b>6,88</b> <b>(2,34;</b> <b>10,08) *</b>	13,87 (8,63; 16,88)	0,29	0,98	0,48
ИС ЛПС, у.е.	1,29 (0,90; 1,71)	1,18 (0,76; 1,96)	1,17 (0,72; 1,97)	1,03 (0,77; 1,52)	0,91 (0,81; 1,72)	0,83	0,98	0,53

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05); ФГА – фитогемагглютинин; ЛПС – липополисахарид; ИС – индекс стимуляции пролиферативной активности.

В нашем исследовании до начала противоопухолевого лечения только в подгруппе больных с полной регрессией опухоли ФГА-стимулированная пролиферация лимфоцитов не отличалась от значений, зарегистрированных у здоровых доноров, в то время как в остальных группах больных этот показатель был значимо ниже контрольных значений. Однако ИС ФГА у больных с полной регрессией, как и у пациенток со стабилизацией и прогрессированием опухолевого процесса, был значимо ниже в сравнении с аналогичным показателем здоровых (у больных с частичной регрессией медиана показателя была также ниже, чем в контрольной группе, однако это различие не подтвердилось при статистической обработке данных). Низкие уровни ИС ФГА подтверждают тезис о недостаточности Т-клеточного иммунитета у онкологических больных не только на количественном, но и на функциональном уровне.

Показатели, характеризующие активность кислородозависимых механизмов биоцидности нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови (ФР и ИРФР), во всех подгруппах больных, за исключением пациенток с полной регрессией, были значимо выше в сравнении с показателями здоровых доноров (табл. 9). Наряду с этим, указанные параметры превышали контрольные значения как у больных с наличием (42,50 [18,00;29,00] против 58,50 [26,50;90,50], соответственно), а так и с отсутствием (33,00 [23,00;50,00] против 58,00 [29,00;73,00], соответственно) объективного ответа на НАХТ.

В последнее время появляются сведения о вовлечённости нейтрофильных гранулоцитов в реакции противоопухолевого иммунитета [8, 133]. По данным литературы у пациенток со злокачественными опухолями эндометрия выявлялось существенное снижение фагоцитарной активности нейтрофилов, о чём свидетельствовало достоверное уменьшение фагоцитарного числа [29]. В литературе также приводятся данные о том, что нейтрофилы способны уничтожать или способствовать разрушению раковых клеток, причём, у онкобольных часто регистрируют повышение количества

нейтрофильных лейкоцитов в циркулирующем пуле на фоне снижения эффекторной активности [178, 187, 194, 206]. Отмечается также, что активация нейтрофилов оказывает положительный эффект при адьювантной иммунотерапии опухолевых заболеваний [133].

Таблица 9

**Активность кислородозависимых механизмов биоцидности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови у больных РМЖ до лечения и здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Показатели кислородозависимой фагоцитаной активности нейтрофилов	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4				
ФР, %	34,00 (19,00; 41,00)	<b>45,00</b> <b>(18,00;</b> <b>60,00) *</b>	<b>33,00</b> <b>(23,00;</b> <b>50,00) *</b>	<b>33,00</b> <b>(22,00;</b> <b>52,00) *</b>	17,00 (8,00; 29,50)	0,14	0,47	0,47
ИРФР, у.е.	35,00 (26,00; 67,00)	<b>63,00</b> <b>(27,00;</b> <b>95,00) *</b>	<b>58,00</b> <b>(28,00;</b> <b>87,00) *</b>	<b>55,00</b> <b>(33,00;</b> <b>69,00) *</b>	23,50 (12,00; 45,50)	0,14	0,33	0,36
СПФ, %	4,00 (3,00; 5,00)	6,00 (3,00; 15,00)	6,00 (2,00; 13,00)	4,50 (3,00; 7,00)	7,00 (4,00; 9,00)	0,44	0,46	0,70
ИРСПФ, у.е.	4,00 (3,00; 5,00)	6,00 (3,00; 16,00)	6,00 (2,00; 14,00)	4,50 (3,00; 7,00)	7,00 (4,00; 10,50)	0,44	0,44	0,70

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05); ФР – фагоцитарный резерв; ИРФР – интенсивность реакции фагоцитарного резерва; СПФ – спонтанная кислородзависимая активность нейтрофильных фагоцитов; ИРСПФ – интенсивность реакции спонтанной кислородзависимой активности нейтрофильных фагоцитов.

Согласно результатам настоящего исследования и данных литературы, складывается представление о том, что близкие к норме количественные и функциональные показатели, характеризующие компоненты врождённого иммунитета (NK и фагоцитарное звено), могут служить благоприятным прогностическим признаком высокой эффективности НАХТ, так как наблюдаются преимущественно у больных с начальными стадиями опухолевого процесса, для которых подтверждён прогноз благоприятного исхода НАХТ [292]. Высокие значения показателей, характеризующих

клеточные параметры неспецифического иммунитета, в большей степени ассоциированы с более поздними стадиями развития опухолевого процесса, при которых уже реализовались механизмы супрессии специфических механизмов противоопухолевой защиты, и характерны для пациентов с менее благоприятным прогнозом эффективности НАХТ. Возможно, наши результаты связаны с тем, что если на ранних стадиях онкогенеза противоопухолевый иммунитет обеспечивается специфическими эффекторными реакциями (Т-цитотоксические), то в дальнейшем, по мере утраты опухолевыми клетками способности к экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости, на первый план выступают механизмы врождённого иммунитета [75, 128].

Как уже упоминалось ранее, в нашем исследовании оценивалась секреция цитокинов, в той или иной мере вовлечённых в патогенез опухолевого роста. Цитокины – универсальные медиаторы межклеточных взаимодействий, в том числе – между иммунной системой и опухолью [39]. Многие цитокины обладают прямой противоопухолевой активностью или являются регуляторами противоопухолевого иммунитета и могут рассматриваться в качестве «естественных адъювантов» противоопухолевых иммунных реакций. Значения, характеризующие секрецию *in vitro* цитокинов, для которых по данным литературы доказано активное участие в патогенезе опухолевого роста, представлены в табл. 10. Согласно результатам нашего исследования, значительную роль в реализации противоопухолевых эффектов НАХТ играют провоспалительные цитокины, продуцируемые, главным образом, клетками макрофагально-моноцитарного ряда (TNF- $\alpha$ , IL-1), так как максимальные значения концентраций этих цитокинов характеризовали группу пациенток с полной регрессией опухоли после НАХТ.

Спонтанная секреция TNF- $\alpha$  в культуре мононуклеаров была значимо выше контрольных значений во всех подгруппах больных, за исключением пациенток с прогрессированием опухоли на фоне НАХТ (табл. 10). Причём, у

больных с полной регрессией медиана этого параметра имела максимальное значение, превышая таковую у здоровых доноров в 35,7 раза (558,5 пг/мл против 15,62 пг/мл соответственно). Стимулированная ЛПС секреция TNF- $\alpha$  у больных с полной регрессией опухоли превышала контрольные значения, не достигая при этом уровня статистической значимости ( $p=0,06$ ).

TNF- $\alpha$  является мощным провоспалительным цитокином и может оказывать противоопухолевый эффект путём блокирования кровоснабжения опухолевого узла и некроза опухоли [39]. Клетками-продуцентами TNF- $\alpha$  считаются активированные нейтрофилы, NK- и тучные клетки, моноциты и макрофаги. Рецепторы же к данному цитокину обнаружены на всех клетках организма, за исключением эритроцитов.

Воздействие TNF- $\alpha$  – мощного провоспалительного цитокина, на опухоль при проведении химиотерапии может быть опосредованным (антиангиогенное действие, стимуляция NK-клеток) и прямым (запуск рецептор-опосредованного апоптоза) [62].

В ряде случаев TNF- $\alpha$ , наряду с трансформирующим фактором роста, эпидермальным фактором роста и другими факторами, играет роль сигнальной молекулы, индуцирующей апоптоз [62]. Было доказано, что при стимуляции низкими дозами IL-2 и TNF- $\alpha$  происходит повышение цитотоксической функции NK [69]. Отмечено также, что в результате проведения изолированной перфузии конечности фактором некроза опухоли и препаратом мелфалан наблюдался более частый локальный ответ, в том числе в виде массивного некроза опухоли, в сравнении с применением только мелфалана [221].

Вместе с тем, TNF- $\alpha$  является ангиогенным цитокином, и в некоторых ситуациях может стимулировать кровоснабжение опухоли, а также усиливать пролиферацию опухолевых клеток, синтез ростовых факторов, и, таким образом, стимулировать развитие рака [120]. С другой стороны, не исключено, что активная пролиферация опухолевых клеток под влиянием



высоких уровней TNF- $\alpha$  делает опухоль чувствительной к цитостатическому воздействию НАХТ.

Активированные фагоциты, секретируя TNF- $\alpha$  и другие цитокины, оказывают повреждающее действие на клетки опухолей. Известно, что TNF- $\alpha$  индуцирует продукцию супероксидных радикалов в нейтрофилах [168]. Таким образом, TNF- $\alpha$  может оказывать влияние как на механизмы адаптивного, так и на механизмы врождённого иммунитета, и обладает целым рядом противоопухолевых свойств, такими, как подавление васкуляризации, прямое повреждающее действие на опухолевые клетки и регуляция воспалительной реакции.

Спонтанная секреция IL-1 в супернатанте клеточных культур больных с полной регрессией была значимо выше в сравнении с показателями здоровых доноров ( $p=0,04$ ). При этом уровень секреции данного цитокина у больных с полной регрессией был достоверно повышен в сравнении с уровнями у пациенток с частичной регрессией и стабилизацией опухолевого процесса (табл. 10) (кратность различий значений медиан достигала 8 – 14 раз). Стимулированная ЛПС секреция IL-1 в группе больных с полной регрессией опухоли также регистрировалась на уровне относительно высоких значений в сравнении с другими группами больных и контролем, однако статистически достоверность этих различий не подтвердилась.

Роль IL-1 во взаимодействии организма и опухоли неоднозначна. Известно, что данный цитокин оказывает гемопозитический и противоопухолевый эффект, а также может стимулировать продукцию ряда цитокинов [71]. Сопоставимые с нашими результатами данные были получены в 2009 г. Serah S.C. и Bower J.E.: пациенты с наивысшим уровнем позитивного воздействия радиотерапии показали наиболее высокие средние уровни IL-1 $\beta$  и IL-6 [264].

Согласно данным мультицентрового исследования выявлено, что уровень экспрессии IL-1 играет значительную роль при РМЖ [289]. Группой исследователей было доказано, что активация IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD8+-

T-клеток погибающими опухолевыми клетками нарушается в отсутствие функционирующего IL-1-рецептора 1, при дефиците Nlpr3 (Nlrp3(-/-)) или недостаточности каспазы-1 (Casp-1(-/-)) у мышей, за исключением тех случаев, если опухолевые клетки не подвергаются влиянию IL-1 $\beta$  [102].

В ряде исследований отмечается негативная роль IL-1 для прогноза онкологических заболеваний. Сообщается, что IL-1 может быть вовлечён в выживание, пролиферацию опухолевых клеток и опухолевый ангиогенез [196]. Кроме того, представлены данные о том, что повышенная секреция IL-1 связана с более агрессивными формами РМЖ [219].

Следует отметить, что IL-1 обладает одним из наиболее широких спектров биологической активности по сравнению с другими цитокинами. В частности, IL-1 способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и стимулировать в паравентрикулярном ядре гипоталамуса секрецию кортиколиберина, который, в свою очередь, повышает продукцию гипофизом адренокортикотропного гормона, индуцирующего выброс из коры надпочечников глюкокортикоидных гормонов [5, 16]. При развёртывании острой фазы воспаления это ведёт к усилению воздействия факторов стресса на все системы и оказывает мощный ингибирующий эффект на экспрессию интерлейкиновых генов, что сдерживает активацию иммунной системы. Негативное воздействие избытка глюкокортикоидов на иммунную систему проявляется в уменьшении количества циркулирующих T- и B-лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов, которые депонируются в лимфоидной ткани [38].

Спонтанная секреция IL-10 мононуклеарами больных с прогрессирующим опухолевым процессом, а также ФГА-стимулированная секреция данного цитокина у пациенток с прогрессирующим и стабилизацией опухоли, были снижены в сравнении с показателями больных, у которых наблюдалась полная регрессия первичного опухолевого узла после НАХТ (табл. 10). Причём, медианы значений этого показателя в подгруппах

больных, сформированных с учётом эффективности НАХТ, уменьшались в направлении от полной регрессии к прогрессированию опухоли.

IL-10 обладает как иммуносупрессивными, противовоспалительными, так и антиангиогенными свойствами. Кроме того, согласно данным исследования, выполненного на мышах, IL-10 может реализовывать противоопухолевую активность через активацию внутриопухолевых цитотоксических CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессию ими гранзимов, или опосредованно, стимулируя продукцию интерферона-гамма Т-хелперами-1 и экспрессию молекул, представляющих опухолевые антигены [197].

Имеются данные о том, что IL-4 предотвращает апоптоз Т-регуляторных клеток, развивающийся преимущественно по Fas-зависимому, а не по TNF $\alpha$ -зависимому пути, усиливает их пролиферацию и повышает супрессорную активность, но ослабляет экспрессию Foxp3 и супрессорную активность изолированных Т-регуляторных клеток, хотя не влияет на их активность при совместном культивировании Т-регуляторных лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток [205].

У пациенток с прогрессированием первичной опухоли уровень спонтанной секреции IL-4 был достоверно снижен в сравнении с показателем здоровых доноров ( $p=0,002$ ). Показатели же стимулированной секреции IL-4 были значимо ниже, в сравнении с контролем, у больных с частичной регрессией и стабилизацией опухолевого роста (табл. 10).

Как спонтанная, так и стимулированная ФГА, секреция IL-4 были значимо ниже контрольных показателей у больных с наличием и с отсутствием объективного ответа на НАХТ, т.е. низкий уровень секреции IL-4 характерен для всех больных РМЖ, причем, минимальные значения этого показателя ассоциированы с прогрессированием опухолевого процесса на фоне НАХТ (табл. 10).

Наличие некоторых противоречий между данными литературы и результатами настоящего исследования может быть объяснено различной ролью данных цитокинов на локальном и организменном уровнях, разными

механизмами воздействия на опухоль в условиях проведения химиотерапии и без неё, реализацией преимущественно локальных или системных эффектов рассматриваемых цитокинов.

Таблица 10

**Спонтанная и стимулированная секреция цитокинов  
у больных РМЖ до лечения и у здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Концентрация цитокинов	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4				
IL-1 <sub>сп</sub> , пг/мл	<b>2914,00 (784,00; 5528,00) *</b>	209,00 (100,00; 1300,00)	235,00 (119,00; 1025,00)	727,50 (253,50; 3000,50)	344,50 (146,00; 1224,00)	<b>0,03*</b>	<b>0,049*</b>	0,24
IL-1 <sub>ст</sub> , пг/мл	4237,00 (1184,50; 8251,50)	1715,00 (816,00; 5850,00)	1600,50 (546,00; 3500,00)	1691,00 (892,00; 2943,00)	1716,00 (436,00; 3598,00)	0,53	0,20	0,34
IFN-γ <sub>сп</sub> , пг/мл	160,00 (110,00; 271,00)	113,50 (13,50; 657,00)	165,00 (25,50; 245,00)	78,75 (19,50; 255,00)	82,75 (23,00; 138,75)	0,90	0,83	0,44
IFN-γ <sub>ст</sub> , пг/мл	765,00 (253,25; 2590,00)	219,00 (69,00; 637,00)	302,50 (185,00; 769,00)	859,50 (46,00; 1310,00)	598,00 (375,00; 3500,00)	0,21	0,38	0,83
IL-2 <sub>сп</sub> , пг/мл	16,10 (5,30; 42,35)	7,75 (2,00; 30,00)	1,20 (0,00; 29,60)	15,90 (6,70; 27,00)	9,30 (0,00; 14,10)	0,54	0,34	0,93
IL-2 <sub>ст</sub> , пг/мл	10,10 (0,00; 22,10)	12,30 (0,00; 30,80)	7,55 (0,00; 100,00)	13,25 (5,15; 16,65)	27,90 (0,00; 55,80)	0,59	0,62	0,52
IL-10 <sub>сп</sub> , пг/мл	94,70 (34,20; 241,00)	42,85 (3,80; 212,30)	14,70 (0,00; 141,00)	8,95 (3,65; 14,25)	20,40 (4,80; 54,90)	0,60	0,23	<b>0,04*</b>
IL-10 <sub>ст</sub> , пг/мл	269,60 (134,65; 369,15)	129,00 (32,40; 698,00)	17,25 (7,10; 132,70)	17,10 (11,40; 77,10)	47,10 (14,20; 245,80)	0,77	<b>0,046*</b>	<b>0,04*</b>
IL-4 <sub>сп</sub> , пг/мл	7,60 (0,00; 18,90)	7,30 (0,00; 16,70)	2,70 (0,00; 16,90)	<b>7,05 (3,50; 9,50) *</b>	12,20 (9,90; 14,30)	0,99	0,88	0,81
IL-4 <sub>ст</sub> , пг/мл	9,20 (0,60; 23,10)	<b>6,70 (0,00; 18,40) *</b>	<b>1,40 (0,00; 18,10) *</b>	12,90 (6,70; 22,30)	13,30 (12,40; 16,00)	0,47	0,35	0,90

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05); сп – спонтанная секреция цитокина. ст – стимулированная секреция цитокина.

Как уже упоминалось ранее, TNF- $\alpha$  способен инициировать апоптоз. В настоящем исследовании была изучена роль молекул, относящихся к суперсемейству фактора некроза опухолей и их лигандов.

Относительное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD95-молекулу (представитель суперсемейства рецепторов для TNF) у пациенток со стабилизацией процесса было значимо выше в сравнении с содержанием данной субпопуляции клеток у здоровых доноров, а абсолютное – у пациенток с частичной регрессией и стабилизацией опухоли (табл. 11). При этом относительное и абсолютное количество CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов у больных с наличием объективного ответа (13 [7,00; 21,50] и 0,21 [0,13; 0,35], соответственно), так же, как относительное и абсолютное количество клеток данной субпопуляции у пациенток с отсутствием объективного ответа на НАХТ (13 [9,00; 21,00] и 0,22 [0,13; 0,42], соответственно), превышали значения контрольной группы. Этот факт, в совокупности с данными о результатах морфологической оценки апоптоза в МНПК (табл. 11), может косвенно свидетельствовать о большей готовности к апоптозу лимфоцитов у больных РМЖ, чем у здоровых доноров.

Следует отметить, что максимально высокие значения показателей, представляющих потенциально проапоптозные для опухоли факторы, отмечены в подгруппе пациентов с полной регрессией опухоли. В этой подгруппе до лечения было зарегистрировано значимо более высокое в сравнении с контролем относительное количество клеток, экспрессирующих на мембране молекулу, инициирующую апоптоз по Fas-зависимому пути – CD95-лиганд (FasL), и обладающих, таким образом, потенциальной противоопухолевой цитотоксичностью (табл. 11). Высокий уровень CD95-лиганд-положительных лимфоцитов может свидетельствовать о реализации Fas-зависимого пути апоптоза опухолевых клеток и вовлечённости лимфоцитов, несущих на поверхности FasL в противоопухолевый эффект химиотерапии [170]. Показано, что FasL может экспрессироваться активированными Т- и В-лимфоцитами, НК-клетками, нейтрофилами, а

также клетками некоторых нелимфоидных тканей [10, 173]. В исследовании, выполненном Обуховой В.В. и др., (2004), была выявлена тенденция к увеличению уровня экспрессии FasL лимфоцитами периферической крови: в 5 из 6 случаев наблюдалось его повышение в 1,4-5,4 раза, что связывалось с присутствием в крови больных цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных в отношении аномальных клеток [73]. Следовательно, полная регрессия первичной опухоли при НАХТ у больных РМЖ могла происходить при участии цитотоксических механизмов противоопухолевого иммунитета, в том числе за счет адаптивных иммунных реакций. При этом наличие опухолеспецифичных клонов лимфоцитов у данных пациенток не отразилось на количественном изменении циркулирующих в крови субпопуляций клеток. Анализ средних значений концентрации в сыворотке растворимого FasL выявил статистически значимо более высокий уровень этого белка у больных с наличием объективного ответа на НАХТ в сравнении с показателем больных без такового (табл. 11, 12).

При статистической обработке с использованием метода  $\chi^2$  было показано, что у больных с наличием растворимого FasL НАХТ была более эффективна, нежели у пациенток с отсутствием циркулирующего в крови FasL (табл. 12). Регрессионный анализ также показал сопряжённость высокой концентрации данного проапоптозного агента с благоприятным исходом НАХТ (рис. 9). Известно, что Fas-опосредованный апоптоз может быть реализован как с участием FasL-несущих клеток, так и с участием растворимых молекул FasL, например, содержащихся в циркулирующей крови [74]. Не исключено, что данный путь запуска апоптозного каскада может привести к гибели Fas-положительных опухолевых клеток.

Имеются свидетельства того, что процесс запуска апоптозного каскада может инициироваться также при воздействии Fas-рецептора на Fas-лиганд [84]. Известна также физиологическая роль растворимого Fas-лиганда как ограничителя воспалительной реакции. В данном случае функция молекулы заключается в инициации апоптоза иммуноцитов.

**Маркёры апоптоза у больных РМЖ до лечения и у здоровых доноров  
(Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Маркёры апоптоза	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
CD95, x10 <sup>9</sup> /л	0,20 (0,12; 0,40)	<b>0,21</b> <b>(0,12;</b> <b>0,34)*</b>	<b>0,25</b> <b>(0,14;</b> <b>0,48) *</b>	0,19 (0,11; 0,26)	0,11 (0,07; 0,20)	0,83	0,65	0,27
CD95, %	10,00 (8,00; 15,00)	13,50 (7,00; 22,00)	<b>14,00</b> <b>(9,00;</b> <b>22,00) *</b>	12,00 (7,00; 14,00)	9,00 (7,00; 11,00)	0,70	0,40	0,79
CD95L, %	<b>24,00</b> <b>(20,50;</b> <b>38,00)*</b>	17,00 (9,00; 30,00)	23,00 (11,00; 41,00)	19,50 (14,00; 31,00)	17,00 (12,00; 21,00)	0,10	0,51	0,37
TNF-α, пг/мл	<b>558,50</b> <b>(55,00;</b> <b>3140,00)*</b>	<b>127,15</b> <b>(15,00;</b> <b>425,70)*</b>	<b>105,50</b> <b>(59,00;</b> <b>450,00) *</b>	42,00 (6,00; 259,00)	15,65 (1,70; 52,00)	0,16	0,33	0,09
TNF-α ст, пг/мл	1514,00 (1000,00; 9550,00)	579,60 (162,00; 1702,00)	633,90 (162,80; 1673,00)	190,00 (158,00; 589,00)	322,00 (94,00; 772,00)	0,22	0,16	0,20
Относительное содержание МНПК с морфологическими признаками апоптоза, %	<b>28,00</b> <b>(20,50;</b> <b>47,50) *</b>	<b>30,00</b> <b>(22,00;</b> <b>46,00) *</b>	<b>30,50</b> <b>(23,00;</b> <b>39,50) *</b>	<b>25,00</b> <b>(21,00;</b> <b>30,00) *</b>	12,00 (8,00; 16,00)	0,92	0,93	0,54
sFas, нг/мл	26,90 (25,20; 30,20)	29,30 (24,25; 39,30)	27,10 (22,70; 42,20)	37,90 (26,10; 68,20)	36,20 (30,25; 40,95)	0,74	0,80	0,36
sFasL, нг/мл	<b>0,08 (0,00;</b> <b>0,10)*</b>	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,81	0,05	0,27

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05); sFas – растворимый Fas-рецептор; sFasL – растворимый Fas-лиганд.

В работе М. Такака и соавт. (1998) показана роль sFasL как негативного регулятора апоптоза, осуществляемая путём формирования комплексов Fas–FasL, подвергающихся быстрой интернализации и деградации, что снижает поверхностный уровень Fas [156]. В связи с этим,

способность опухолевых клеток к продукции sFasL, наряду с наличием апоптозного потенциала в Fas-позитивных клетках, играет важную роль в судьбе опухоли: её росте, метастазировании, снижении противоопухолевого иммунитета [55].

Относительное количество МНПК с морфологическими признаками апоптоза было достоверно повышено во всех группах больных в сравнении с показателями здоровых доноров (табл. 11). Высокий уровень апоптоза мононуклеаров, характерный для всех групп больных РМЖ, возможно, является свидетельством иммуносупрессивного влияния опухоли, проявляющегося в ускоренной гибели иммунокомпетентных клеток [28, 42, 74, 106, 156, 175, 232, 261, 270, 271, 302, 305]. Известно, что определённые субпопуляции клеток крови подвержены апоптозу в разной степени [172]. Как обсуждалось в главе 1, различным может также быть и механизм запуска апоптозного каскада [25]. В настоящем исследовании судить об уязвимости конкретных клеточных субпопуляций и доминирующих механизмах реализации апоптоза мы можем только косвенно.

Концентрация Fas-лиганда у больных с полной регрессией была выше контроля. При анализе концентрации в сыворотке растворимого Fas-рецептора мы не выявили статистически значимых отличий в сравнении с показателями здоровых доноров и между подгруппами больных (табл. 11).

### **3.2. Содержание растворимого сывороточного Fas-лиганда у больных РМЖ с различной эффективностью НАХТ**

Fas-лиганд, в частности растворимая его форма, является эффектором Fas-опосредованного апоптоза. Роль данного белка представляет интерес в связи с его способностью инициировать процесс апоптоза, который, в свою очередь, задействован в контроле роста тканей, в том числе опухолевых. В настоящем исследовании растворимый Fas-лиганд не выявлялся в сыворотке большинства больных. Пациенток, у которых в сыворотке крови была обнаружена эта молекула, целесообразно было объединить в одну группу для



более тщательного анализа. При обработке данных с использованием метода Фишера было выявлено статистически значимое повышение частоты выявления растворимого Fas-лиганда в сыворотке больных с объективным ответом на НАХТ ( $p=0,037$ ), при этом, у больных без объективного ответа не было зарегистрировано ни одного случая выявления Fas-лиганда в сыворотке крови (табл. 12).

Таблица 12

**Частота выявления растворимого Fas-лиганда у больных с различной эффективностью НАХТ**

Эффективность НАХТ	sFasL <sup>-</sup> n (%)	sFasL <sup>+</sup> n (%)	Итого n (%)	Уровень значимости различий (p)
Наличие объективного ответа	17 (81)	4 (19)	21 (100)	<b>0,037</b>
Отсутствие объективного ответа	25 (100)	0 (0)	25 (100)	

Примечание:

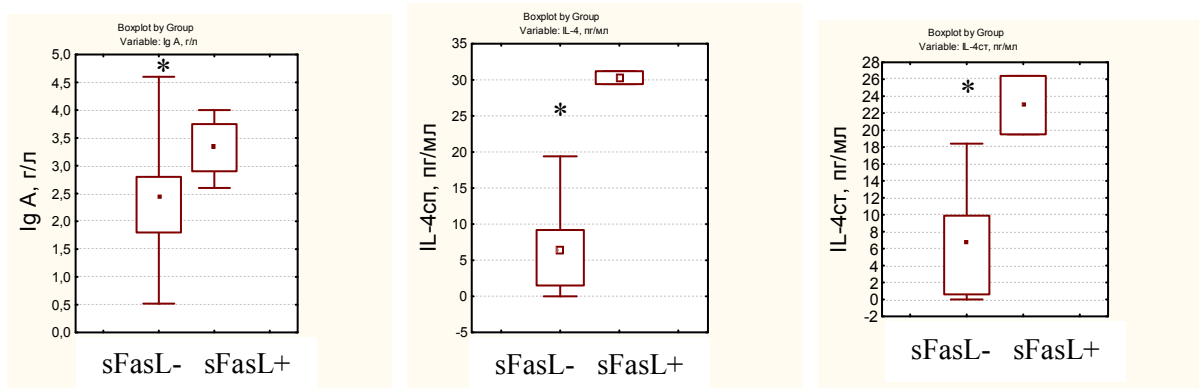
n – число обследованных;

sFasL<sup>+</sup> – наличие растворимого FasL в сыворотке;

sFasL<sup>-</sup> – отсутствие растворимого FasL в сыворотке.

До лечения иммунный статус больных, у которых было зарегистрировано наличие в сыворотке растворимого Fas-лиганда, отличался от иммунного статуса пациенток с негативным результатом выявления FasL значимо более высокой спонтанной и стимулированной секрецией IL-4 и высокой концентрацией IgA (рис. 1).

Можно предположить, что некоторые из выявленных нами изменений обусловлены эффекторной функцией растворимого Fas-лиганда. Кроме того, наличие объективного ответа опухоли на лечение прямо коррелировало ( $r=0,3$ ) с концентрацией в сыворотке Fas-лиганда, что является дополнительным подтверждением роли данного белка в обеспечении эффективности НАХТ.

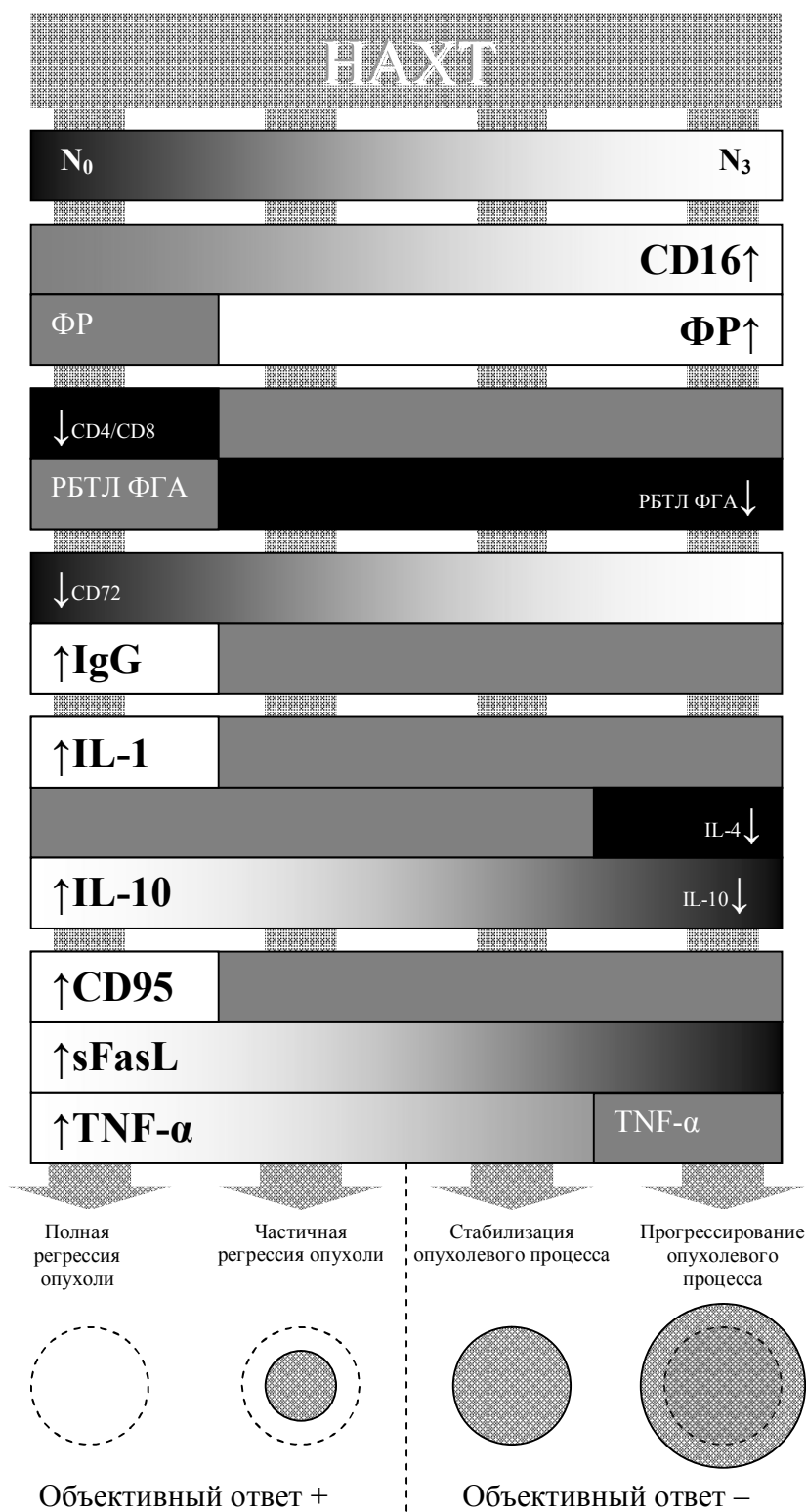


**Рис.1. Особенности иммунологических показателей (до лечения) пациенток с наличием и отсутствием растворимого Fas-лиганда в сыворотке**

\* – значимые различия между подгруппой больных с наличием и отсутствием растворимого Fas-лиганда в сыворотке ( $p < 0,05$ );  
 sFasL<sup>+</sup> – наличие растворимого FasL в сыворотке;  
 sFasL<sup>-</sup> – отсутствие растворимого FasL в сыворотке.

В целом, подводя итоги интегральной оценки параметров иммунного статуса больных РМЖ до лечения в сравнении с показателями здоровых доноров, следует отметить признаки угнетения Т-клеточного звена, высокое абсолютное и относительное содержание в циркулирующей крови В-клеток, активированных лимфоцитов с готовностью к апоптозу (CD95<sup>+</sup>-лимфоциты) и морфологическими признаками апоптоза.

С полной регрессией опухоли после НАХТ ассоциировались следующие особенности иммунологических параметров, оцененных до начала лечения: высокое количество в ПК мононуклеаров, экспрессирующих CD95L, низкие значения иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8), высокая концентрация IgG в сыворотке, близкий к значению здоровых доноров уровень пролиферативной активности лимфоцитов под действием ФГА (в остальных подгруппах этот показатель снижен), близкие к норме значения ФР и ИРФР (в отличие от больных с худшим эффектом НАХТ, у которых эти показатели были выше нормы), высокие показатели спонтанной секреции IL-1, а также спонтанной и стимулированной ФГА секреции IL-10 (рис.2).



**Рис.2. Особенности средневыворочных характеристик иммунного статуса (до лечения) у пациенток с различной эффективностью НАХТ**

Примечание:

↑ или ↓ – показатель повышен или снижен относительно уровня здоровых доноров и/или между группами больных (см. гл. 3);

ФР, ИРФР – фагоцитарный резерв, интенсивность реакции фагоцитарного резерва;

РБТЛ ФГА – ФГА-стимулированная реакция пролиферация лимфоцитов;

N<sub>0</sub>, N<sub>3</sub> – степень метастатического поражения регионарных лимфоузлов.

Следует отметить, что уровень спонтанной секреции TNF- $\alpha$  в культуре мононуклеаров до начала противоопухолевого лечения превышал значения контрольной группы у всех больных, за исключением тех, которые продемонстрировали прогрессирование опухолевого процесса на фоне НАХТ. По-видимому эффективность НАХТ прямо связана с исходно высоким уровнем продукции TNF- $\alpha$ , а способность к секреции данного цитокина на уровне значений, близких к норме, отражает неблагоприятную ситуацию в плане дальнейшей реализации противоопухолевого эффекта НАХТ.

С прогрессированием опухолевого процесса были сопряжены высокое относительное и абсолютное содержание CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов, близкие к норме значения концентрации IgG в сыворотке, спонтанной и стимулированной секреции IL-10 и спонтанной секреции IL-4 (рис. 2).

### **3.3. Корреляционные взаимосвязи между иммунологическими параметрами у больных РМЖ с различной эффективностью НАХТ**

В предыдущих разделах главы были обсуждены результаты оценки иммунного статуса больных РМЖ, полученные на основании сравнения среднегрупповых и частотных характеристик при различной эффективности НАХТ. Представляют интерес особенности взаимодействия изученных параметров между собой в зависимости от эффективности НАХТ. Прогностическое значение и практическую значимость имеют количественные значения показателей, сопряжённых с различными результатами НАХТ. В первую очередь нас интересовали те показатели иммунного статуса, для которых на предыдущих этапах исследования была выявлена связь с высокой эффективностью НАХТ.

С целью исследования особенностей взаимосвязей различных иммунологических параметров у больных каждой подгруппы (до и после НАХТ) и здоровых доноров был проведён корреляционный анализ по Спирмену [63]. В качестве дополнительного параметра при корреляционном анализе учитывался такой интегральный показатель эффективности НАХТ,

как изменение размера опухоли (% от исходного). Были выявлены особенности формирования взаимозависимостей между звеньями иммунной системы при различной эффективности НАХТ, что является дополнительным свидетельством вовлечённости иммунной системы в реализацию противоопухолевого эффекта химиотерапии (табл. 13).

У здоровых доноров, а также у больных с полной, частичной регрессией и стабилизацией опухолевого процесса до лечения, преобладали прямые корреляционные связи между иммунологическими показателями. У пациенток с прогрессированием опухоли, напротив, обратных корреляционных связей было значительно больше, чем прямых. После НАХТ направленность и количество связей существенно изменились: у больных с полной регрессией число обратных корреляционных связей преобладало над количеством прямых, а во всех остальных подгруппах было зарегистрировано преобладание прямых связей.

Помимо количества и направленности корреляционных связей необходимо учитывать их силу (тесноту). Принято выделять слабые корреляционные связи ( $r=0,2 - 0,5$  по модулю), связи средней силы ( $r=0,5 - 0,75$  по модулю), сильные ( $r=0,75 - 0,95$  по модулю) и очень сильные ( $r=0,95 - 1,0$  по модулю) [63]. Считается, что чем сильнее корреляционная связь, тем большее значение имеет взаимодействие этих показателей для функционирования системы в данных условиях. Однако слабые связи могут существенно дополнять представление о процессах, происходящих в организме.

В ячейках табл. 13 на первом месте указано количество корреляционных связей с коэффициентом корреляции ( $r$ ) от 0,5 до 1,0 по модулю. В скобках указано общее количество связей, включая слабые ( $r=0,2 - 0,5$  по модулю).

**Количество корреляционных связей между показателями  
иммунограммы у больных РМЖ до лечения и после 2 курсов НАХТ, и  
здоровых доноров**

Группы	Количество связей					
	Прямые связи		Обратные связи		Всего	
	До лечения	После НАХТ	До лечения	После НАХТ	До лечения	После НАХТ
Здоровые доноры	22 (29)	-	7 (8)	-	29 (37)	-
Полная регрессия	10 (10)	1 (1)	2 (2)	4 (4)	12 (12)	5 (5)
Частичная регрессия	14 (39)	9 (13)	2 (6)	7 (13)	16 (45)	16 (26)
Стабилизация опухоли	9 (18)	19 (26)	7 (21)	14 (20)	16 (39)	33 (46)
Прогрессирование опухолевого процесса	4 (4)	3 (3)	11 (11)	1 (1)	15 (15)	4 (4)

Корреляционные взаимодействия между исследованными параметрами представлены в виде схем (рис. 3-7). На рис.3 и далее (рис. 4-7) отображены корреляционные связи, определенные как до (серые линии), так и после НАХТ (цветные линии). В виде сплошной линии представлены прямые (положительные) связи; пунктирной линией обозначены обратные (отрицательные) корреляционные взаимосвязи. Сила связи выражена толщиной линий.

Для выявления особенностей функционирования иммунной системы в физиологических условиях в первую очередь была проведена оценка корреляционных взаимодействий между параметрами иммунного статуса у **здоровых доноров** (рис.3). Выявлено 37 корреляционных связей между изучаемыми показателями, из которых 29 были прямыми, а 8 – обратными, (из них слабыми были – 8, 7 и 1 связь соответственно). Наиболее тесно в корреляционные взаимодействия были вовлечены показатели, отражающие спонтанную пролиферативную активность лимфоцитов и численность субпопуляций лимфоцитов, за исключением CD4<sup>+</sup>- и CD25<sup>+</sup>-клеток. Большое количество корреляционных взаимодействий также было

свойственно таким параметрам, как количество CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, соотношение CD4/CD8, уровень спонтанной секреции TNF- $\alpha$  и IL-10, стимулированной секреции IL-1, и показатели фагоцитарной активности нейтрофилов.

В состоянии функционального напряжения, о котором косвенно можно судить по выявлению корреляционных зависимостей между анализируемым параметром и другими показателями иммунограммы, находились все субпопуляции клеток, за исключением CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов. Повышенное содержание провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$  прямо коррелировало с показателями, отражающими активность фагоцитарного звена, что также вполне закономерно. Уровень стимулированной секреции IL-1 был прямо связан с интенсивностью спонтанной и стимулированной пролиферации лимфоцитов, а спонтанная секреция IL-2 обратно коррелировала с активностью кислородозависимых механизмов микробицидности нейтрофилов.

IL-10 был активно вовлечён в систему корреляционных взаимосвязей. Была выявлена отрицательная связь (средней силы) этого параметра с IgG, положительная корреляция со спонтанной пролиферативной активностью, что свидетельствует о функциональном напряжении иммунносупрессорных механизмов и, возможно, об активной регуляторно-ограничительной направленности иммунитета у здоровых доноров. IL-10 также прямо коррелировал с количеством CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов, среди которых присутствуют Treg (основные продуценты IL-10), выполняющие супрессорную функцию. Зафиксирована прямая корреляция между показателями, характеризующими апоптоз лимфоцитов и их способность к пролиферации, что, вероятно, отражает определенное равновесие между двумя функциональными состояниями лимфоцитов.

Таким образом, у здоровых взаимозависимо функционируют механизмы врождённого и приобретённого иммунитета при полноценном супрессорном контроле иммунных процессов.

*У больных с полной регрессией первичной опухоли* до лечения было выявлено 12 связей между изучаемыми показателями иммунного статуса, из них 10 были прямыми, а 2 – обратными (рис. 4). Все связи, кроме одной ( $r=-0,71$ ), были сильными или очень сильными. В корреляционные взаимодействия были вовлечены показатели, характеризующие спонтанную и стимулированную зимозаном активность нейтрофильных фагоцитов в НСТ-тесте, CD16+-, CD72+-, CD25+-лимфоциты, соотношение CD4/CD8, уровни иммуноглобулинов, ЦИК и интерлейкинов-1, 4 и 10. Наибольшее количество корреляционных связей приходилось на показатели, характеризующие активность фагоцитов (7 связей), что, по-нашему мнению, отражает функциональное напряжение этого звена. Индекс стимуляции нейтрофилов был связан сильными прямыми корреляционными связями с количеством CD16+- и CD25+-клеток и уровнем спонтанной секреции IL-10. Высокий уровень секреции последнего по результатам ранее проведённой математической обработки был сопряжён с высокой эффективностью НАХТ. В совокупности с наличием прямой связи между IL-10 и количеством CD25+-лимфоцитов можно предположить, что активация механизмов врождённого иммунитета и Т-регуляторных лимфоцитов является характерной особенностью функционирования иммунной системы больных с полной регрессией опухоли при НАХТ. Показатели же спонтанной активности фагоцитов были связаны очень сильной прямой связью с уровнем спонтанной секреции провоспалительного цитокина IL-1, ( $r=0,97$ ), в отношении высокого уровня секреции которого также была зарегистрирована связь с высокоэффективной НАХТ. Абсолютное количество клеток другого эффекторного звена врождённого иммунитета – естественных киллеров – было связано сильной обратной корреляционной связью с уровнем циркулирующих иммунных комплексов ( $r=-0,89$ ). Количество CD72+-лимфоцитов было связано сильными прямыми связями с IgA и ИС ЛПС, IgM – со спонтанной секрецией IL-4, а ИС ЛПС – обратной корреляционной связью средней силы с соотношением CD4+/CD8+-клеток,



что может отражать функциональную напряжённость гуморального звена иммунитета. Основная функция IgA - защита эпителиальных тканей. Молочная железа – один из эффекторных участков, где возможен синтез данного изотипа иммуноглобулина. Прямая связь IL-4 с IgM, возможно, отражает активацию гуморального звена под влиянием Th2.

Таким образом, до лечения у больных с полной регрессией опухоли в состоянии функционального напряжения находились механизмы врождённого иммунитета, В-клеточное звено, и, возможно, супрессорные механизмы иммунитета (CD25+ и IL-10). Признаков активного вовлечения Т-клеточного звена в кооперативные взаимоотношения с другими параметрами иммунной системы не было выявлено.

После лечения у больных с полной регрессией опухоли количество корреляционных связей сократилось до пяти, причём четыре из них были обратными, то есть обратные связи стали преобладать над прямыми (рис.4). Все выявленные корреляционные взаимодействия были сильными. Единственная прямая связь наблюдалась между соотношением CD4+/CD8+-клеток и ФГА-стимулированной пролиферативной активностью лимфоцитов. Учитывая, что ФГА стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов, можно предположить, что после лечения у больных с полной регрессией опухоли Т-клетки восполняются в основном за счёт CD4+-лимфоцитов. Соотношение CD4+/CD8+-клеток было также связано обратными корреляционными связями с показателями, характеризующими спонтанную активность нейтрофильных фагоцитов в НСТ-тесте. Были зарегистрирована отрицательная корреляционная связь IL-4 с ИС ФГА ( $r = -0,97$ ) и обратная корреляционная зависимость между уровнями секреции IL-10 и сывороточного IgM ( $r = -0,9$ ).

Следует отметить, что после НАХТ, у больных с полной регрессией опухоли естественные киллеры, CD72+ и CD25+-клетки не были вовлечены в активные корреляционные взаимодействия. При этом в трёх из пяти выявленных корреляционных связей был задействован иммунорегуляторный

индекс, который представляет собой соотношение CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-субпопуляций лимфоцитов. Данный параметр был связан с показателями, характеризующими фагоцитарное звено, обратными связями, что может являться свидетельством оппозитного реагирования двух звеньев иммунитета (CD4<sup>+</sup>-клеток и фагоцитов) – повышенная функциональная активность одного на фоне ослабления функционирования другого. Такие же признаки «функционального антагонизма» отмечались между параметрами клеточного и гуморального звеньев иммунитета.

*У больных с частичной регрессией* до лечения было выявлено 45 корреляционных связей, преобладающее большинство которых (39) были прямыми и только 6 – обратными (табл. 13, рис.5), при этом высокое значение коэффициента корреляции ( $r > 0,5$ ) было характерно для 14 прямых и 2-х обратных корреляционных связей. В корреляционные взаимодействия у больных данной подгруппы было включено большинство изучаемых в исследовании компонентов иммунного статуса, за исключением следующих: CD95<sup>+</sup>-клетки, ИС ФГА, ИС ЛПС, уровень спонтанной активации кислородзависимых механизмов биоцидности нейтрофилов, спонтанная и стимулированная секреция TNF- $\alpha$ , спонтанная секреция IL-2 и стимулированная секреция IFN- $\gamma$ . Отличительной особенностью подгруппы больных с частичной регрессией в сравнении с больными с полной регрессией являлось незначительное вовлечение в корреляционные взаимоотношения компонентов неспецифического иммунитета. Наибольшее количество корреляционных связей было зарегистрировано между различными субпопуляциями лимфоцитов, а также их спонтанной и стимулированной ЛПС пролиферативной активностью, кроме того – со стимулированной, и, в меньшей степени, спонтанной секрецией IL-4. Зафиксированы обратные корреляции между абсолютным количеством CD8<sup>+</sup>-клеток и показателями функциональной активности нейтрофилов, в отличие от группы здоровых, у которых данные связи были прямыми. Уровни спонтанной секреции IFN- $\gamma$ , стимулированной секреции IL-10, а

также спонтанной и стимулированной секреции IL-4 были сопряжены с показателями, характеризующими интенсивность апоптоза. Концентрация антиапоптозного фактора – растворимого Fas-рецептора в сыворотке коррелировала сильной прямой связью с уровнем спонтанной секреции IFN- $\gamma$  и IL-10 и абсолютным количеством лимфоцитов, а содержание в сыворотке Fas-лиганда было сопряжено с показателями спонтанной и стимулированной секреции IL-4. По-видимому, несмотря на высокий уровень апоптоза в популяции лимфоцитов, остаются функционально активными продуценты IL-10, IL-4 и IFN- $\gamma$ , то есть косвенно можно судить о сохранности иммунорегуляторной активности основных субпопуляций Т-хелперов: Th1, Th2 и CD4+CD25+-клеток (Treg).

Итак, по результатам корреляционного анализа у данной категории больных наблюдались признаки вовлечения во взаимодействия Т- и В-звеньев иммунитета. Однако преобладание корреляционных взаимодействий, замыкающихся на показателях гуморального звена иммунитета, может свидетельствовать о его высокой функциональной активности у больных с частичной регрессией опухоли.

После НАХТ количество корреляционных связей между исследованными параметрами у больных с частичной регрессией опухоли сократилось (за счет уменьшения количества прямых связей) до 26 (рис.5), Было выявлено 9 прямых и 7 обратных корреляционных связей средней силы и выше ( $r > 0,5$ ). Исчезли прямые связи между количественными показателями Т-звена со спонтанной и стимулированной пролиферативной активностью лимфоцитов и IL-4. Наибольшее количество связей (8) было свойственно показателям, характеризующим функциональную активность нейтрофилов. Эти параметры были связаны обратными корреляционными связями с CD8+-лимфоцитами – клетками, которые считаются основными эффекторами противоопухолевого иммунитета. Показатели, характеризующие спонтанный уровень активации кислородозависимых механизмов биоцидности нейтрофилов, обратно коррелировали со стимулированной секрецией IL-10,

и были связаны сильными прямыми связями с процентом МНПК с морфологическими признаками апоптоза. Последний параметр обратно коррелировал с уровнем ЦИК ( $r=-0,78$ ) и был связан прямой корреляционной связью со спонтанной пролиферативной активностью лимфоцитов. ( $r=0,35$ ). Связи Т-звена с ИЛ-4 изменились с прямых на обратные, появились прямые связи стимулированной секреции ИЛ-2 с показателями, характеризующими функциональную активность нейтрофилов. Уровень спонтанной секреции ИЛ-10 прямо коррелировал со спонтанной пролиферативной активностью мононуклеаров, CD72+-лимфоциты были прямо связаны с ИС ФГА.

Итак, у пациенток с частичной регрессией опухоли, как и у больных с полной регрессией, после лечения сократилось количество корреляционных связей между компонентами иммунного статуса. Показатели, характеризующие нейтрофильный фагоцитоз, до лечения не были задействованы во взаимодействиях между компонентами иммунного статуса, в частности, не были связаны с провоспалительными цитокинами, в отличие от здоровых доноров и больных с полной регрессией. После лечения же произошло включение параметров, отражающих функциональную активность нейтрофильного звена, во взаимодействия с компонентами, характеризующими состояние адаптивного иммунитета у данной подгруппы больных, выявились признаки «функционального антагонизма» между Т- и В-звеньями иммунной системы, интенсивность апоптоза МНПК была сопряжена с функциональной активностью фагоцитарного звена.

До лечения у *больных со стабилизацией опухолевого процесса* общее количество корреляционных связей между показателями иммунного статуса составляло 39, из них 18 были прямыми, а 21 – обратными (16, 9 и 7 связей соответственно были средней силы и выше). Соотношение прямых и обратных связей было смещено в сторону последних в сравнении с особенностями схем корреляционных взаимоотношений больных с полной и частичной регрессии (рис.6). Наибольшее количество корреляционных взаимодействий в данной подгруппе больных замыкались на показатель,

отражающий процент МНПК с морфологическими признаками апоптоза. Показатели, отражающие функциональную активность гуморального иммунитета, такие, как пролиферативная активность лимфоцитов под действием ЛПС, ИС ЛПС, концентрация IgM, IgA, а также количество CD72<sup>+</sup>-клеток и уровень секреции IL-4 были активно вовлечены в корреляционные взаимодействия с различными компонентами иммунного статуса. Были зарегистрированы корреляционные связи со всеми показателями, характеризующими абсолютные значения исследуемых в работе субпопуляций лимфоцитов, за исключением CD95<sup>+</sup>-клеток. Связи стимулированной секреции IL-1 с Т-звеном (CD3<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>- лимфоцитами) и естественными киллерами (CD16<sup>+</sup>-клетки) были обратные. IL-2 и IL-4 были вовлечены во взаимодействия в наибольшей степени, но наблюдались в основном обратные корреляционные связи (высокая пролиферативная способность сочеталась с низкой функциональной активностью). Показатели, характеризующие фагоцитарную функцию нейтрофилов, также были связаны обратными корреляционными связями со спонтанной и стимулированной секрецией IL-4, а также спонтанной секрецией IL-2. Секреция IL-4 положительно коррелировала с пролиферативной активностью В-клеток, что является дополнительным свидетельством активного функционирования гуморального звена в данной подгруппе больных. Показатели, отражающие абсолютное содержание CD72<sup>+</sup> и CD25<sup>+</sup>-клеток в ПК, были прямо связаны с уровнем МНПК, экспрессирующей CD95-молекулу, что подтвердило наше предположение о предшествующей лечению активации В-звена. Возможно, субпопуляции CD72<sup>+</sup> и CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов в большей степени подвержены апоптозу. Концентрация в сыворотке растворимого Fas-рецептора прямо коррелировала со спонтанной секрецией IL-4 и уровнем предуготованных к апоптозу МНПК (CD95<sup>+</sup>).

Таким образом, до начала НАХТ в иммунной системе больных с последующей стабилизацией опухолевого отмечены признаки функционального напряжения гуморального звена и вовлеченность

апоптотических процессов, затрагивающих МНПК, во взаимодействия между исследованными параметрами.

После лечения количество корреляционных связей между показателями иммунной системы у больных со стабилизацией опухолевого процесса возросло и достигло 46-ти, что может служить свидетельством активации внутрисистемных механизмов регуляции под воздействием цитостатиков. Было зарегистрировано 26 прямых и 20 обратных корреляционных связей, из них 19 и 14 соответственно были средней силы и выше ( $r > 0,5$ ). Вовлечённость всех субпопуляций лимфоцитов в корреляционные взаимодействия после лечения у больных со стабилизацией опухолевого процесса возросла в сравнении с исходным уровнем. Регистрировалось большое количество корреляционных связей между количественными субпопуляционными характеристиками и показателями функциональной активности Т-клеточного звена иммунитета (стимулированной ФГА пролиферативной активностью лимфоцитов и ИС ФГА), что может говорить о его функциональном напряжении. Также значительно возросла вовлечённость в корреляционные взаимодействия уровня TNF- $\alpha$  и лимфоцитов с высокой экспрессией CD95. Оба параметра задействованы в механизмах апоптоза. Кроме того, уровень спонтанной секреции TNF- $\alpha$  прямо коррелировал с концентрацией растворимого Fas-рецептора в сыворотке, а процент МНПК с морфологическими признаками апоптоза был связан очень сильной прямой корреляционной связью с уровнем спонтанной секреции IL-10 ( $r = 0,95$ ). Выявились обратные связи показателей, характеризующих фагоцитарную функцию нейтрофилов, с естественными киллерами, CD72 $^{+}$ - и CD95 $^{+}$ -клетками и общим количеством лимфоцитов. Параметры, характеризующие функциональную активность фагоцитарного звена, были объединены положительными связями с уровнем провоспалительных цитокинов и отрицательными связями – с количеством CD72 $^{+}$ -, CD16 $^{+}$ -клеток и общим количеством лимфоцитов. Появились прямые корреляции между уровнем провоспалительного и

проапоптотического TNF- $\alpha$  с концентрацией растворимого Fas-рецептора, и между IL-10 и содержанием CD95<sup>+</sup>-МНПК. Кроме того, появились положительные связи концентрации IgG с уровнями TNF $\alpha$ , IL-1 и IFN $\gamma$ , чего не отмечалось в других подгруппах после лечения.

Таким образом, особенностью функционирования иммунной системы данной подгруппы больных является взаимозависимость между уровнями секреции провоспалительных цитокинов и количественными параметрами гуморального иммунитета, вовлечение механизмов клеточного иммунитета в корреляционные взаимодействия после НАХТ и высокая степень связанности с другими исследованными параметрами показателей, характеризующих процессы апоптоза лимфоцитов.

До лечения *у больных с прогрессирующим опухолем на фоне НАХТ* наблюдались только средние и сильные корреляционные связи (рис. 7), из них 4 были прямыми, а 11 – обратными, то есть обратные корреляции значительно преобладали над прямыми.

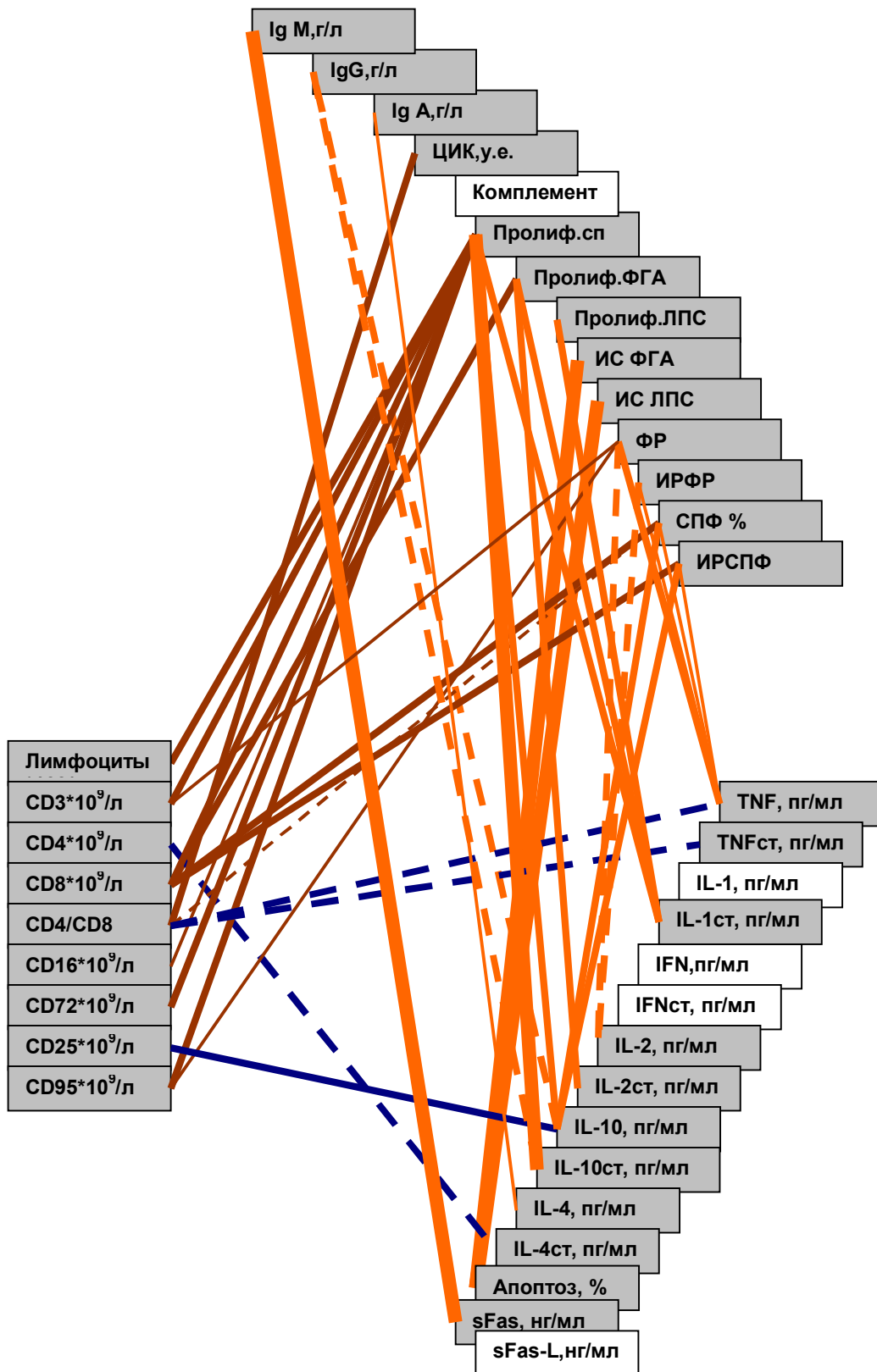
Наибольшее количество выявленных взаимосвязей (10) имело отношение к показателям фагоцитарного звена; было зарегистрировано 3 корреляционные связи с параметрами, характеризующими процесс апоптоза МНПК. Причём, прямые связи были зафиксированы с показателями спонтанной фагоцитарной активности нейтрофилов, а обратная – с фагоцитарным резервом. Показатель фагоцитарного резерва обратно коррелировал с уровнем стимулированной продукции TNF- $\alpha$ , а показатели спонтанной фагоцитарной активности нейтрофилов – с уровнем IFN $\gamma$ , абсолютным количеством лимфоцитов и CD8<sup>+</sup>-клеток. Кроме того, наблюдалась обратная корреляция уровня стимулированной продукции TNF- $\alpha$  с количеством CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, а стимулированной секреции IL-2 – с иммунорегуляторным индексом (CD4/CD8). Уровень другого провоспалительного цитокина (IL-1) был связан прямыми сильными связями с количеством CD4<sup>+</sup>- и CD95<sup>+</sup>-клеток.

Данная подгруппа больных по количеству выявленных корреляционных связей между иммунологическими параметрами была схожа с подгруппой пациенток с полной регрессией опухоли после НАХТ. Однако, те звенья иммунитета, которые были активно вовлечены у больных с полной регрессией (CD16+, CD72+, CD25+), в данной подгруппе не были включены в структуру схемы корреляционных взаимоотношений. Зафиксированы были преимущественно обратные корреляционные связи, в отличие от больных с полной регрессией, у которых преобладали прямые корреляционные связи между параметрами ИС. Следует отметить, что с показателями, характеризующими функциональную активность фагоцитов, обратно коррелировали абсолютные количества CD8+-клеток и лимфоцитов, что, возможно отражает своеобразные «антагонистические» взаимоотношения между механизмами врождённого и приобретённого иммунитета.

После лечения у больных подгруппы с прогрессированием опухоли между показателями иммунного статуса выявлялись только 4 корреляционные связи (3 прямых и 1 обратная) – минимальное количество в сравнении с другими подгруппами больных (рис.11). Все выявленные связи имели отношение к блоку показателей, характеризующих интенсивность апоптотических процессов. Абсолютный уровень CD8+- ( $r=0,9$ ), CD16+-лимфоцитов ( $r=0,9$ ) и концентрация IgA в сыворотке ( $r=0,97$ ) прямо коррелировали с количеством клеток с признаками апоптоза. Была зафиксирована также обратная связь между абсолютным количеством CD95+-лимфоцитов и пролиферативной активностью В-клеток ( $r=-0,89$ ).

После лечения у больных с прогрессированием опухоли исчезли все связи исследованных параметров с блоком цитокинов и отсутствовали связи с показателями, характеризующими функциональную активность нейтрофильных фагоцитов, которые до лечения были представлены в большом количестве (табл.13, рис.7).

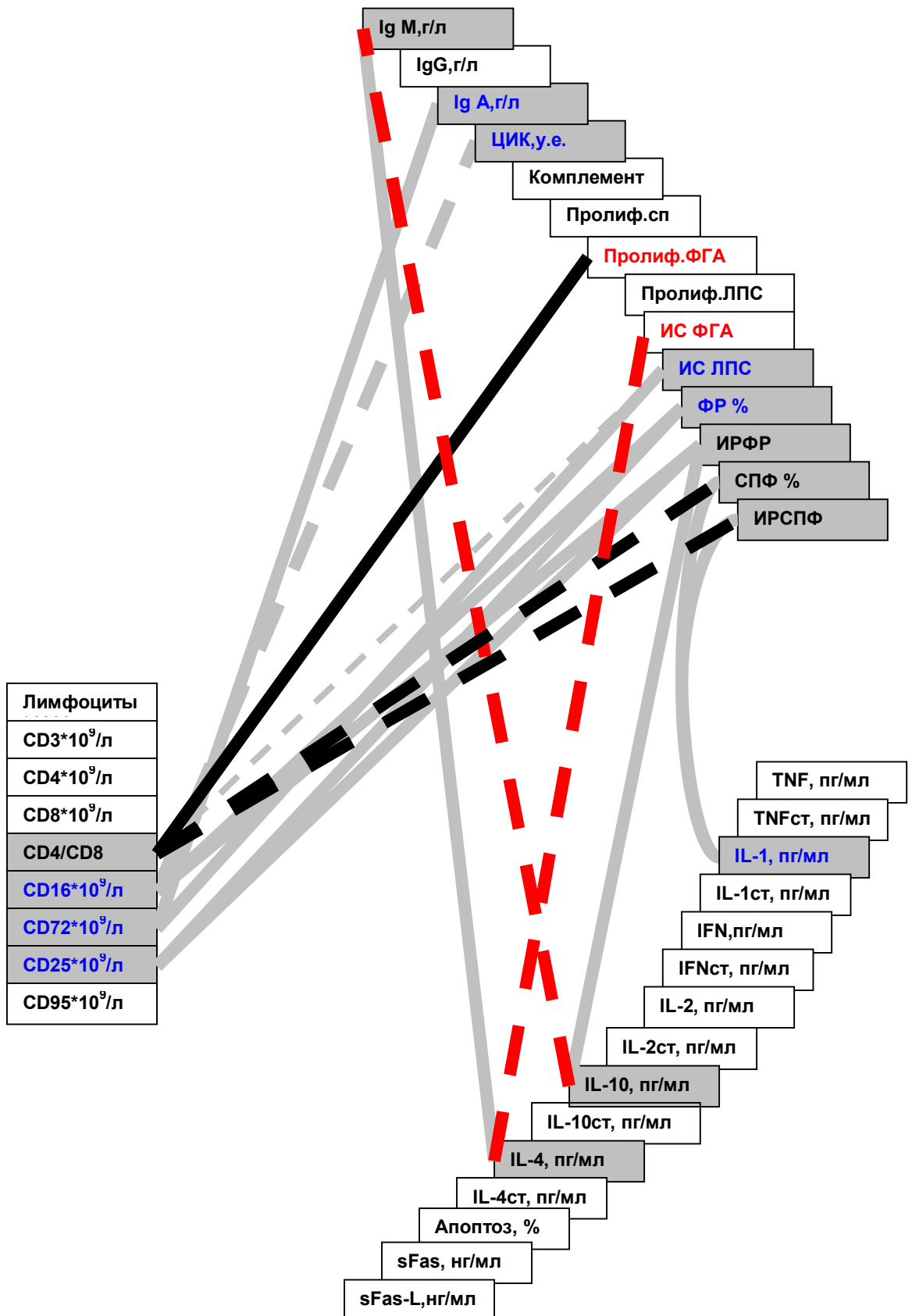




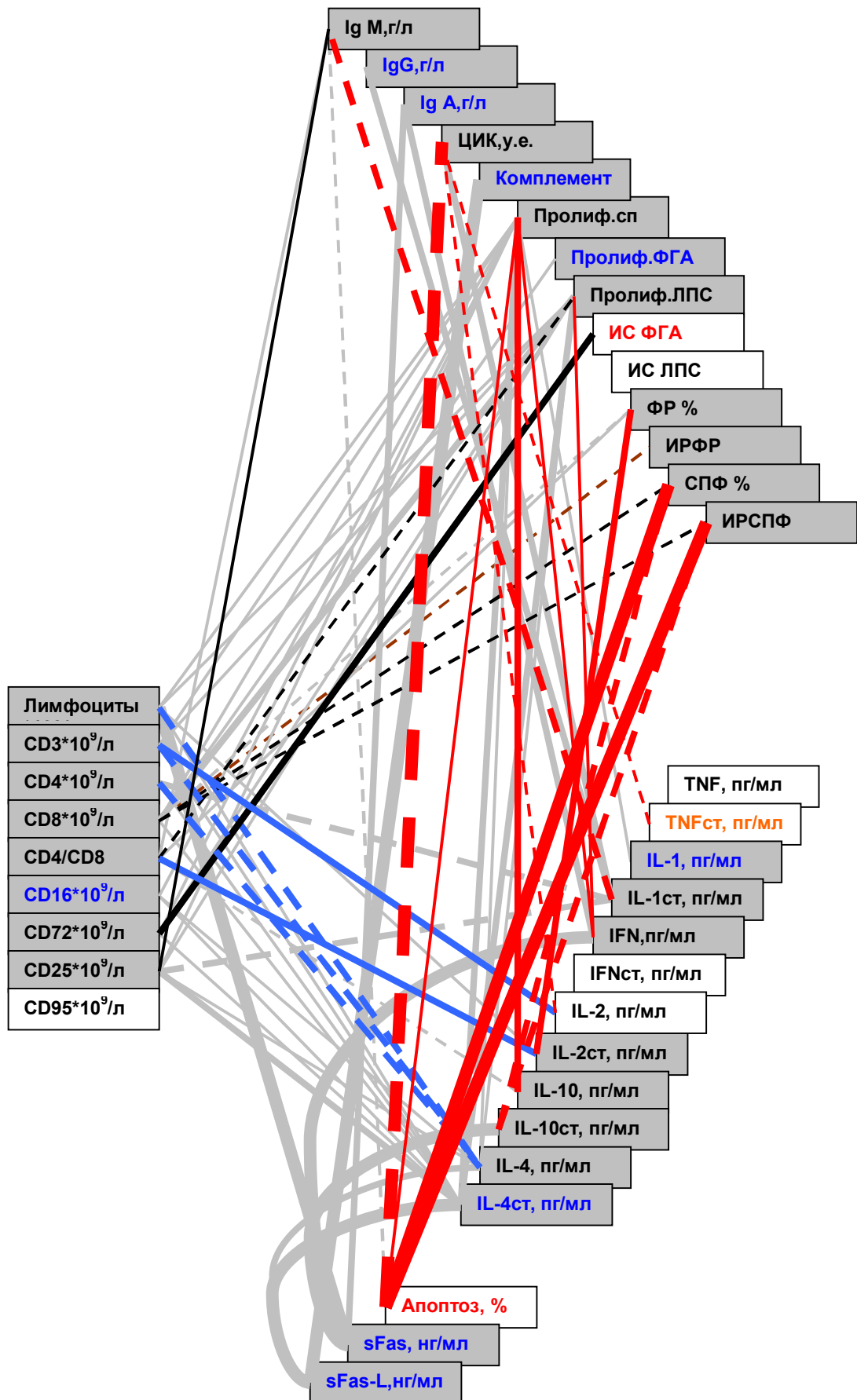
**Рис. 3. Корреляционные связи между компонентами иммунной системы у здоровых доноров**

Примечание (здесь и далее на рис. 2-6): сплошная линия – прямая корреляция; пунктирная линия – обратная корреляция;

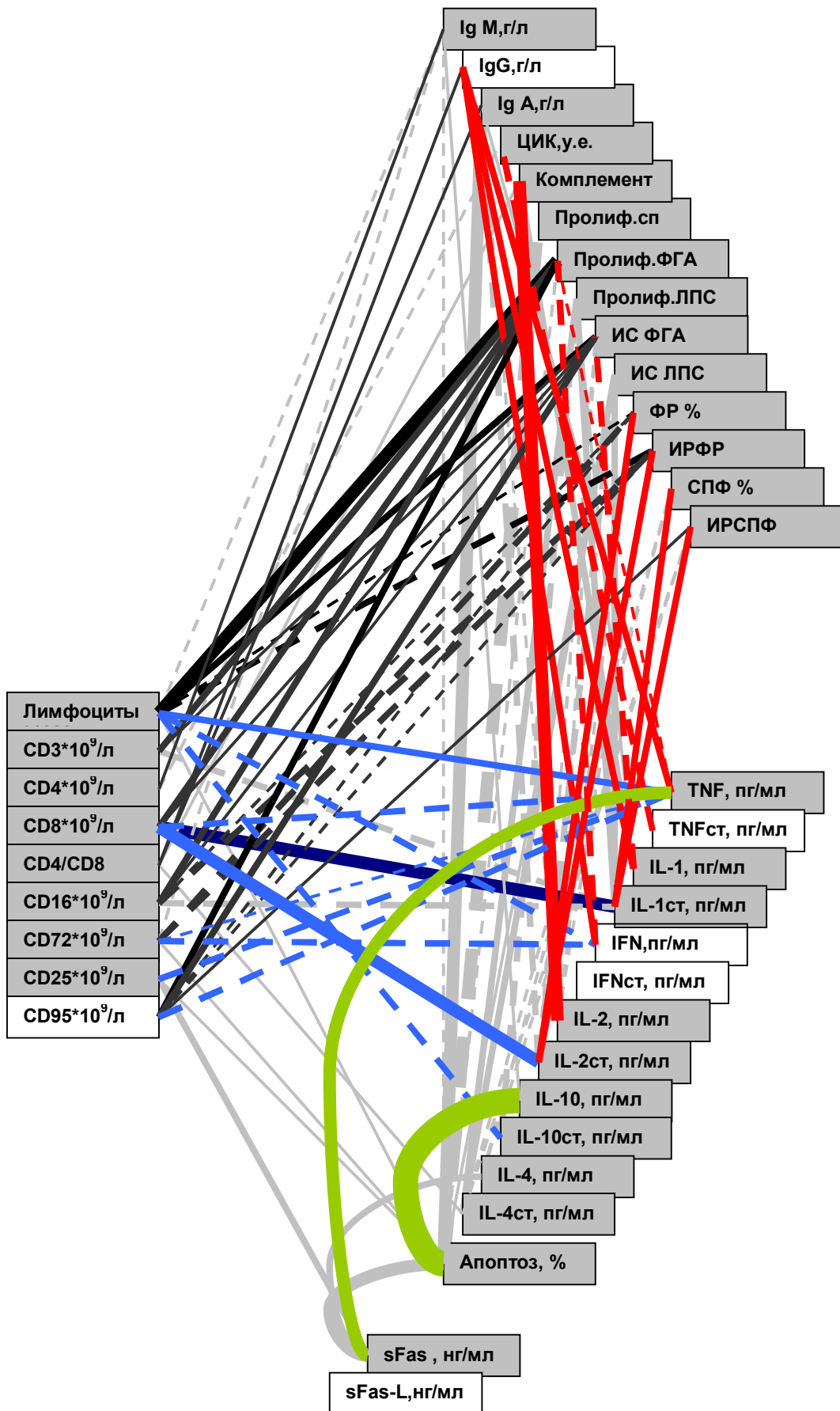
- |   |     |           |                                  |
|---|-----|-----------|----------------------------------|
| — | или | - - - - - | - слабая связь (0,2-0,5)         |
| — | или | - - - - - | - связь средней силы (0,5-0,75)  |
| — | или | ■ ■ ■ ■ ■ | - сильная связь (0,75-0,95)      |
| — | или | ■ ■ ■ ■ ■ | - очень сильная связь (0,95-1,0) |



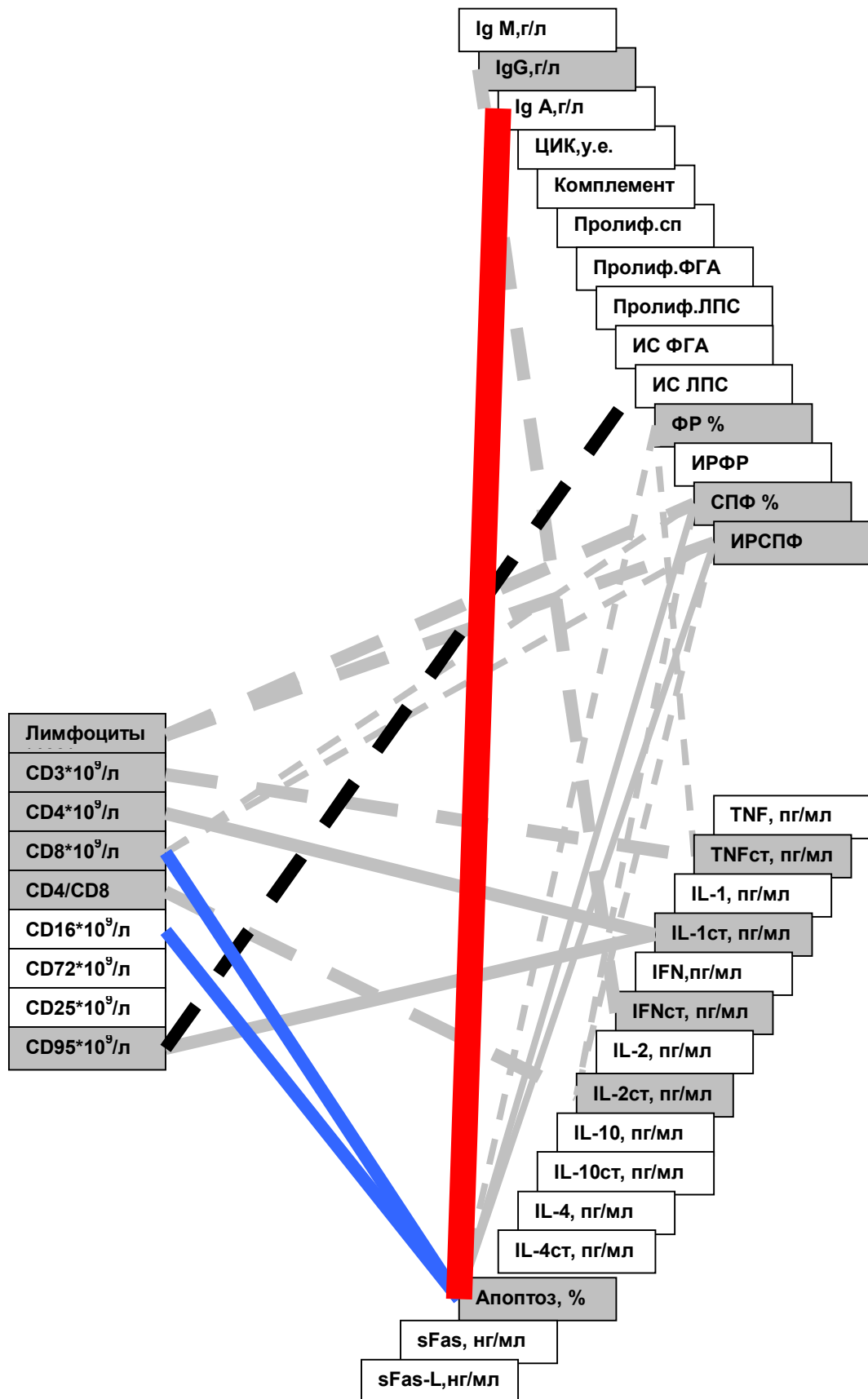
**Рис. 4. Корреляционные связи между компонентами иммунной системы до и после НАХТ у больных с полной регрессией первичной опухоли**



**Рис. 5. Корреляционные связи между компонентами иммунной системы до и после НАХТ у больных с частичной регрессией первичной опухоли**



**Рис. 6.** Корреляционные связи между компонентами иммунной системы до и после НАХТ у больных со стабилизацией опухоли



**Рис. 7. Корреляционные связи между компонентами иммунной системы до и после НАХТ у больных с прогрессированием опухоли**

Обобщая результаты анализа схем корреляционных взаимоотношений между исследованными параметрами иммунной системы, мы выявили определенные закономерности.

Так, у *здоровых доноров* в корреляционные взаимодействия были вовлечены все субпопуляции иммунокомпетентных клеток.

У больных с *полной регрессией опухоли* Т-звено практически не было задействовано в корреляционных взаимосвязях, при этом в корреляционные схемы включались CD16+, CD72+ и CD25+-клетки, а также нейтрофилы (т.е. регистрировались признаки активации компонентов врожденного иммунитета, В-звена и механизмов, ограничивающих функциональную активность адаптивного иммунитета (IL-10)).

У больных с *частичной регрессией опухоли* наблюдалась тенденция к ослаблению функциональной активности фагоцитарного блока, при этом отмечены признаки активации Т- и В-звена, большую роль в регуляции иммунных процессов играл IL-4.

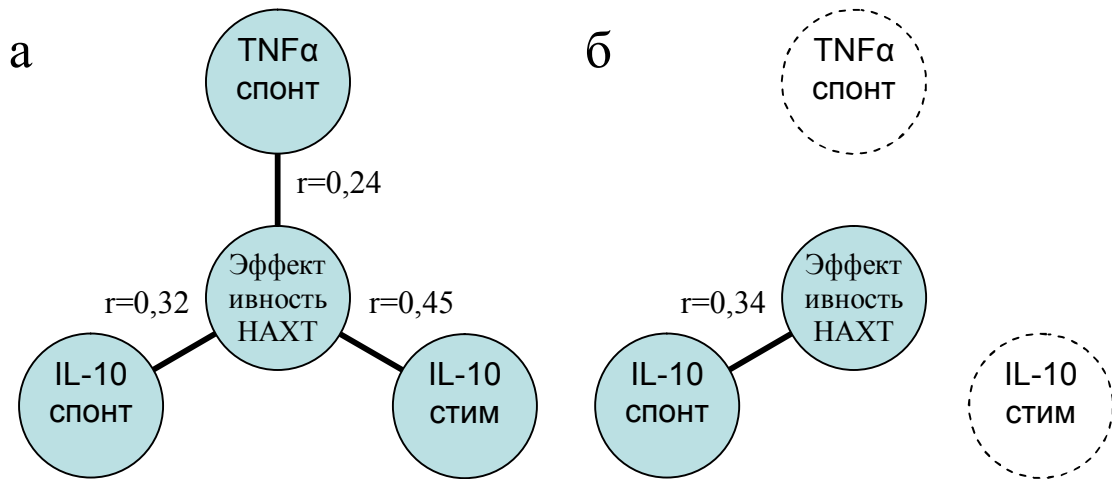
Особенности функционирования иммунной системы больных со *стабилизацией опухолевого процесса* отличались тем, что параметры, характеризующие Т-звено, были связаны обратными корреляционными связями с уровнями провоспалительных цитокинов, основными продуцентами которых являются клетки моноцитарно-макрофагального ряда, т.е. имеют место признаки разобщения механизмов врожденного и приобретенного иммунитета.

У больных с *прогрессированием опухоли* естественные киллеры, В- и Т-регуляторные клетки были выключены из сети корреляционных взаимодействий. Блок количественных показателей, характеризующих Т-звено иммунной системы, был связан с показателями, отражающими фагоцитарную функцию нейтрофилов. С показателями, отражающими функциональную активность лимфоцитов, корреляционных связей не наблюдалось. После лечения в данной подгруппе больных выявились только

единичные связи, замыкающиеся на показателе, отражающем интенсивность апоптоза МНПК.

Результаты корреляционного анализа подтверждают наше предположение о более благоприятной для прогноза НАХТ ситуации, при которой относительный функциональный покой клеточного звена (CD3, CD8 и CD4) на фоне активации и пролиферации CD16+, CD72+ и CD25+-лимфоцитов способствует сохранению численности Т-клеток при воздействии цитостатиков. Возможно, что CD25+-лимфоциты, среди которых присутствуют Treg-лимфоциты с иммуносупрессорными свойствами, будучи функционально активными, в большей степени подвергаются апоптозу под влиянием цитостатических препаратов, и, таким образом, наряду с относительной сохранностью Т-звена, при воздействии НАХТ снижается супрессорный потенциал иммунных реакций.

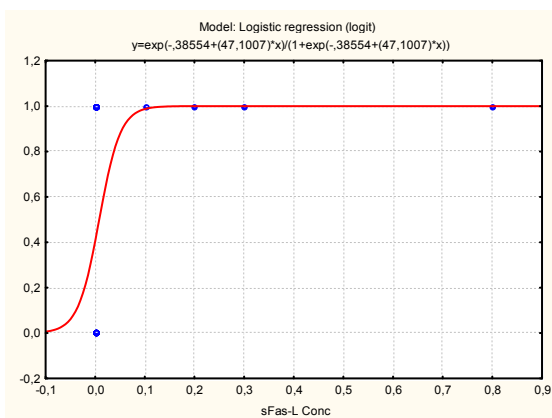
Выбрав в качестве независимой переменной эффективность НАХТ, оцененную в процентах уменьшения размера первичной опухоли от исходного уровня, и, не разделяя контингент обследованных пациентов на подгруппы, мы построили корреляционные модели зависимости эффективности НАХТ от иммунных параметров, оцененных до (рис. 8а) и после лечения (рис. 8б). В первую корреляционную схему вошли уже отмеченные ранее TNF- $\alpha$  и IL-10: выявлены достоверная прямая корреляционная связь между эффектом НАХТ (в % от первоначального размера опухоли) и уровнями спонтанной ( $r=0,318$ ) и стимулированной секреции IL-10 ( $r=0,45$ ), а также спонтанной секреции TNF- $\alpha$  ( $r=0,237$ ). Следует отметить, что после лечения сохранилась лишь связь эффективности НАХТ с уровнем секреции IL-10 ( $r=0,34$ ).



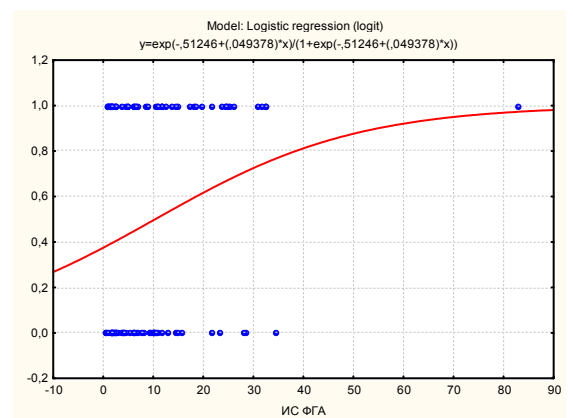
**Рис. 8. Корреляционная зависимость эффективности НАХТ от иммунологических параметров до (а) и после (б) лечения**

### 3.4. Выявление ассоциации эффективности НАХТ и иммунологических показателей методом логистической регрессии

Применив *метод логистической регрессии* при сравнении групп больных с эффективной (полная и частичная регрессия первичной опухоли) и неэффективной (стабилизация и прогрессирование опухолевого процесса) НАХТ, мы выявили ассоциацию эффекта химиотерапии, оцениваемого по уменьшению относительного размера первичной опухоли, от концентрации растворимого Fas-лиганда (чувствительность 100%, специфичность 19%) и значения ИС ФГА (чувствительность 77%, специфичность 49%) (рис. 9-10).



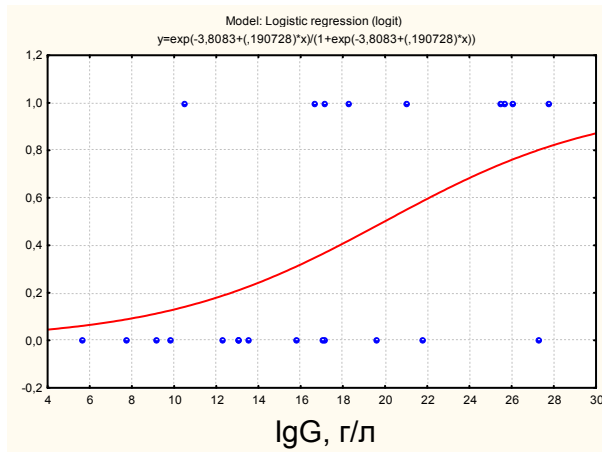
**Рис. 9. Зависимость эффективности НАХТ от концентрации растворимого Fas-лиганда**



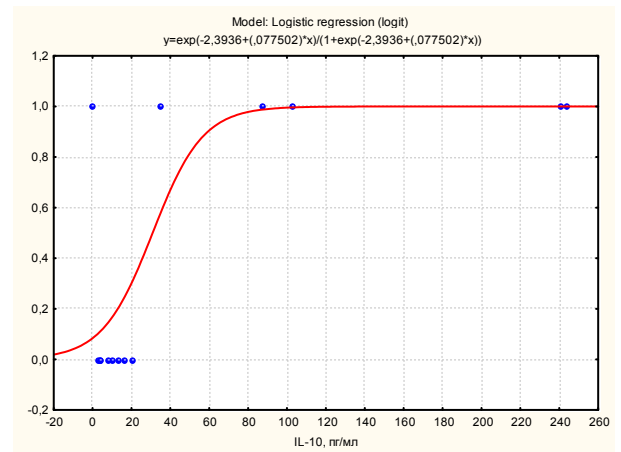
**Рис. 10. Зависимость эффективности НАХТ от индекса стимуляции пролиферативной активности МНПК ФГА**



При сравнении тем же методом подгрупп с полной регрессией и прогрессированием опухоли выявлена также ассоциация эффективности НАХТ и содержания в крови IgG (чувствительность 86%, специфичность 55,6%), и прямая зависимость от спонтанной секреции IL-10 (чувствительность 100%, специфичность 83%) (рис. 11-12).



**Рис. 11. Зависимость эффективности НАХТ от концентрации IgG**



**Рис. 12. Зависимость эффективности НАХТ от уровня спонтанной секреции IL-10**

Следует отметить, что IL-10 по результатам регрессионного (рис. 12) и корреляционного (рис. 8) анализов являлся одним из наиболее важных прогностических маркёров НАХТ.

Важное практическое значение имеет уравнение, построенное нами по результатам регрессионного анализа:

$$y = \exp(-2,3936 + (0,077502) * x) / (1 + \exp(-2,3936 + (0,077502) * x)),$$

где  $y$  – наличие (1,0) или отсутствие (0,0) эффекта НАХТ,

$x$  – концентрация IL-10 в пг/мл (рис. 12).

По нашему мнению, помимо прямого и опосредованного противоопухолевого действия, повышенная способность к секреции цитокина IL-10 у больных с регрессией опухоли на фоне выраженной провоспалительной направленности иммунного статуса может играть компенсаторно-охранительную роль для иммунной системы, подвергающейся воздействию НАХТ.

На основании представленных выше данных можно заключить, что иммунологические параметры, оцененные до начала противоопухолевого лечения, могут быть использованы в качестве дополнительных предикторов эффективности химиотерапии.

### **3.5. Взаимосвязь эффективности НАХТ с клинко-морфологическими характеристиками опухолевого процесса и анамнестическими данными больных РМЖ**

Для достижения цели исследования были оценены клинко-анамнестические данные, результаты морфологического анализа опухоли и показатели, характеризующие состояние иммунной системы больных РМЖ.

Некоторые из оцениваемых нами показателей были предложены на международных конференциях по проблемам РМЖ (Санкт-Галлен, Швейцария, 2005, 2007, 2009) для прогноза течения и исхода заболевания, то есть их прогностическая значимость для отдалённых результатов лечения и связь с патогенезом РМЖ на сегодняшний день считается доказанной [45]. В практической онкологии данные критерии позволяют сделать отдалённый прогноз эффективности лечения и подобрать оптимальные схемы терапии для конкретного пациента. Доказана прогностическая значимость степени поражения регионарных лимфоузлов опухолевыми метастазами ( $N_{0-3}$ ) (основной фактор прогноза отдалённых результатов лечения), размера первичной опухоли ( $T_{1-4}$ ), возраста больной (до 35 лет или старше), степени злокачественности опухоли, экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов и HER-2/neu [45, 292]. Однако степень вовлечённости данных факторов в реализацию механизмов, обеспечивающих частичную или полную регрессию опухоли после НАХТ, в настоящее время изучена недостаточно. Поэтому для выявления иммунологических предикторов эффективности НАХТ прежде необходимо было проверить когорту больных РМЖ на наличие статистической связи уже известных факторов прогноза отдалённых результатов лечения с результатами неoadъювантной химиотерапии. Помимо параметров, утверждённых на конференциях в

Санкт-Галлене, были оценены показатели, вероятность связи которых с патологическим процессом и результатами НАХТ была наиболее ожидаемой и патогенетически обоснованной.

На первом этапе был проведён анализ частоты встречаемости различных клинико-морфологических и анамнестических параметров с использованием критериев  $\chi^2$  Пирсона и Фишера с целью оценки однородности сравниваемых выборок [57].

При делении когорты больных на две подгруппы (наличие или отсутствие объективного ответа на НАХТ) из перечня факторов, характеризующих опухолевый процесс и особенности организма больного (табл. 14), наиболее значимой оказалась степень метастатического поражения регионарных лимфоузлов.

Выявлена неоднородность выборок по частоте встречаемости в подгруппах больных различных степеней метастатического поражения регионарных лимфоузлов ( $N_{0-3}$ ), в частности, в группе с объективным ответом на НАХТ пациентки без поражения регионарных лимфоузлов ( $N_0$ ) составляли 60% (табл. 14), что является ярким подтверждением взаимосвязи метастатического поражения регионарных лимфоузлов с низкой эффективностью НАХТ.

По распространённости (T), клинической форме, гистологическому и цитологическому строению опухоли, степени злокачественности опухоли, характеру фоновых изменений ткани молочной железы, экспрессии эстрогеновых, прогестероновых рецепторов и HER2-neu-рецепторов, а также по возрасту, менструальному статусу, наличию гинекологических заболеваний и онкологически отягощённой наследственности в анамнезе, согласно критерию  $\chi^2$ , выборки были однородны ( $p > 0,05$ ). Следовательно, перечисленные параметры (табл. 14) не были связаны с эффективностью НАХТ.

**Клинико-морфологические характеристики опухолевого процесса  
и анамнестических данных у больных РМЖ с наличием или отсутствием  
объективного ответа на НАХТ**

Критерии обследования		Наличие объективного ответа	Отсутствие объективного ответа
		п, (%)	п, (%)
1	2	3	4
Размер опухоли (T <sub>1-4</sub> ) n=131, p=0,31	Опухоль до 2 см в наибольшем измерении	6(9,84)	4(5,71)
	Опухоль до 5 см в наибольшем измерении	33(54,10)	45(64,29)
	Опухоль более 5 см в наибольшем измерении	16(26,23)	11(15,71)
	Опухоль любого размера с прямым распространением на грудную стенку или кожу	6(9,84)	10(14,29)
Состояние регионарных лимфатических узлов (N <sub>0-3</sub> ) n=130, p=0,008	<b>N<sub>0</sub> – нет признаков поражения метастазами регионарных лимфатических узлов</b>	<b>29(60,00)</b>	<b>19(40,00)</b>
	<b>N<sub>1</sub> – поражение 1-3 регионарных лимфатических узлов</b>	<b>19(44,00)</b>	<b>24(56,00)</b>
	<b>N<sub>2</sub> – поражение 4-9 регионарных лимфатических узлов</b>	<b>13(43,00)</b>	<b>17(57,00)</b>
	<b>N<sub>3</sub> – поражение более 9 регионарных лимфатических узлов</b>	<b>0(0,00)</b>	<b>9(100,00)</b>
Клиническая форма РМЖ n=129, p=0,74	Узловая	41(68,33)	44(63,77)
	Мультицентрическая	13(21,67)	19(27,54)
	Вторичная отёчно-инфильтративная	6(10,00)	6(8,70)
Гистологическое строение первичного опухолевого узла n=121, p=0,86	Протоковый рак	51(96,23)	65(95,59)
	Дольковый рак	2(3,77)	3(4,41)
Фон (состояние окружающих первичную опухоль тканей) n=129, p=0,65	Не измененный	6(10,00)	8(11,59)
	Непролиферативная форма ФКМ	21(35,00)	19(27,54)
	Пролиферативная форма ФКМ	24(40,00)	25(36,23)
	Лейкоцитарная инфильтрация	2(3,33)	3(4,35)
	Фиброз	3(5,00)	3(4,35)
	Инволютивная мастопатия	4(6,67)	11(15,94)
Цитологическая характеристика первичного опухолевого узла n=102, p=0,78	Высокодифференцированная опухоль	9(18,00)	11(21,15)
	Умереннодифференцированная опухоль	33(66,00)	35(67,31)
	Низкодифференцированная опухоль	8(16,00)	6(11,54)

## Продолжение таблицы 14

1	2	3	4
Экспрессия эстрогеновых рецепторов на клетках опухоли n=123, p=0,07	Наличие эстрогеновых рецепторов	29(50,88)	44(66,67)
	Отсутствие эстрогеновых рецепторов	28(49,12)	22(33,33)
Экспрессия прогестероновых рецепторов на клетках опухоли n=123, p=0,35	Наличие прогестероновых рецепторов	28(49,12)	38(57,58)
	Отсутствие прогестероновых рецепторов	29(50,88)	28(42,42)
Уровень экспрессии HER2/neu-рецепторов на клетках опухоли n=102, p=0,68	-	23(50,00)	25(44,64)
	+	6(13,04)	12(21,43)
	++	13(28,26)	13(23,21)
	+++	4(8,70)	6(10,71)
Степень злокачественности опухоли n=113, p=0,24	1	2(4,08)	4(6,25)
	2	45(91,84)	52(81,25)
	3	2(4,08)	8(12,50)
Возраст больных n=130, p=0,51	До 35 лет	2(3,28)	4(5,80)
	Старше 35 лет	59(96,72)	65(94,20)
Сохранность менструальной функции n=129, p=0,34	Менструальный цикл сохранён	38(63,33)	38(55,07)
	Пременопауза	10(16,67)	19(27,54)
	Постменопауза	12(20,00)	12(17,39)
Наличие гинекологических заболеваний в анамнезе n=125, p=0,27	Есть	22(37,93)	32(47,76)
	Нет	36(62,07)	35(52,24)
Наличие онкологических заболеваний у близких родственников n=105, p=0,65	Наследственность неотягощена	26(50,98)	28(51,85)
	Злокачественные опухоли ЖКТ	5(9,80)	6(11,11)
	Злокачественные опухоли лёгкого	5(9,80)	3(5,56)
	Злокачественные опухоли женской репродуктивной системы	3(5,88)	4(7,41)
	РМЖ	8(15,69)	12(22,22)
	Другая локализация	4(7,84)	1(1,85)

Примечание: n – количество обследованных; p – уровень значимости различий.

По результатам статистической обработки с учётом выделения четырёх вариантов эффективности НАХТ неоднородность параметров также выявилась лишь по количеству поражённых регионарных лимфоузлов ( $N_{0-3}$ ). Полная регрессия опухоли в 67% случаев регистрировалась у больных без метастазов ( $N_0$ ). При этом ни у одного больного с высокой степенью

поражения  $N_3$  (вовлечение более 10 лимфоузлов) не наблюдалось объективного клинического ответа на НАХТ (табл. 15).

Таблица 15

**Частота встречаемости разной степени поражения регионарных лимфатических узлов у больных РМЖ с различной эффективностью НАХТ (n, %)**

Объективный ответ на НАХТ	Степень поражения регионарных лимфатических узлов			
	Полная регрессия	Частичная регрессия	Стабилизация опухоли	Прогрессирование опухоли
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
$T_{1-4}N_0M_0$	<b>6(67)</b> , p=0,03	23(44)	14(25)	5(36)
$T_{1-4}N_1M_0$	2(22)	17(33)	18(33)	6(43)
$T_{1-4}N_2M_0$	1(11)	12(23)	16(29)	1(7)
$T_{1-4}N_3M_0$	0(0)	0(0)	7(13)	<b>2(14)</b> , p=0,003
Итого	9(100)	52(100)	55(100)	14(100)

Примечание: n – количество обследованных; p – уровень значимости различий.

Следует отметить, что лимфогенное метастазирование характеризует степень морфологической сохранности периферического отдела иммунной системы, поскольку в результате формирования метастазов происходит замещение лимфоидной ткани малигнизированными клетками. Наличие метастазов в регионарных лимфоузлах может являться свидетельством несостоятельности местных тканевых противоопухолевых иммунных реакций и/или приводить к локальной иммунной недостаточности вследствие структурно-функциональных изменений лимфоузлов. Можно также предположить, что изменения на местном уровне могут быть сопряжены с системными нарушениями функционирования иммунитета. С целью выявления возможной сопряжённости степени поражения регионарных лимфоузлов с иммунологическими показателями циркулирующей крови, была проведена оценка иммунограмм в каждой из четырёх групп пациенток ( $N_0$ ,  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$ ).

**3.6. Особенности иммунологических показателей больных РМЖ с различной степенью поражения регионарных лимфатических узлов**

Оценивая средневыворочные значения исследованных иммунологических параметров до начала лечения в подгруппах пациентов,

сформированных с учетом наличия и степени метастатического поражения лимфоузлов, мы выявили ряд особенностей (табл.16).

Абсолютное количество лейкоцитов у больных со степенью поражения регионарных лимфоузлов  $N_1$  было выше контрольных значений. Относительное и абсолютное количество CD72+-клеток было значимо повышенным по сравнению с группой здоровых во всех подгруппах больных РМЖ. Относительное количество HLA-DR-экспрессирующих лимфоцитов у пациенток со степенью регионарного метастазирования  $N_2$  было значимо выше, чем у больных без метастазов и здоровых доноров. У больных с  $N_1$ - и  $N_2$ -степенями поражения лимфоузлов концентрация IgM была значимо ниже контроля. У пациенток двух крайних групп ( $N_0$  и  $N_3$ ) уровень IgG в сыворотке был значимо выше в сравнении с показателями здоровых доноров. Уровень ЦИК значимо превышал контрольный показатель лишь у больных с  $N_2$ -степенью поражения регионарных лимфоузлов.

ФГА-стимулированная пролиферативная активность лимфоцитов у больных с  $N_2$ -степенью поражения регионарных лимфоузлов была значимо ниже контроля и показателей больных без регионарных метастазов, а у пациенток со степенью поражения регионарных лимфоузлов  $N_1$  – ниже показателей здоровых доноров. ИС ФГА был значимо ниже у больных с  $N_0$ -,  $N_1$ - и  $N_2$ -степенями поражения регионарных лимфоузлов ( $p < 0,05$ ). Показатели, отражающие функциональный резерв нейтрофилов (ФР и ИРФР) были значимо выше контрольных показателей во всех подгруппах больных. При этом показатели спонтанной фагоцитарной активности нейтрофилов (СПФ и ИРСФ) были значимо ниже у больных без регионарных метастазов в сравнении с показателями пациенток с  $N_1$ -степенью поражения регионарных лимфоузлов.

Таблица 16

**Иммунологические показатели больных РМЖ (до лечения) с различной степенью поражения регионарных лимфоузлов (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Показатели иммунного статуса	Степень поражения регионарных лимфоузлов				Здоровые доноры (n=24)
	N <sub>0</sub> (n=48)	N <sub>1</sub> (n=43)	N <sub>2</sub> (n=30)	N <sub>3</sub> (n=9)	
1	2	3	4	5	6
<b>Лейкоциты, x10<sup>9</sup>/л</b>	5,80 (4,40;7,50)	<b>6,40 (5,00; 8,00)*</b>	5,65 (4,90; 7,10)	5,20 (5,00; 10,80)	5,40 (4,20; 6,40)
Палочко-ядерные нейтрофилы, %	0,00 (0,00; 0,00)	2,00 (1,00; 2,50)	0,50 (0,00; 1,00)	0,00 (0,00; 0,00)	1,00 (0,00; 3,00)
Сегменто-ядерные нейтрофилы, %	62,50 (57,50; 65,50)	61,50 (58,00; 70,00)	58,00 (52,00; 61,00)	82,00 (82,00; 82,00)	58,00 (51,00; 67,00)
Эозинофилы, %	2,00 (1,00; 6,00)	2,00 (1,00; 3,00)	2,00 (0,00; 3,00)	0,00 (0,00; 0,00)	3,00 (1,00; 4,00)
Базофилы, %	0,00 (0,00; 0,00)	1,00 (0,00; 2,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 1,00)
Моноциты, %	5,50 (4,00; 7,50)	6,50 (5,00; 8,00)	7,00 (6,00; 8,00)	3,00 (3,00; 3,00)	6,00 (4,00; 8,00)
Лимфоциты, %	31,50 (27,00; 34,00)	28,00 (22,00; 32,00)	29,50 (23,00; 38,00)	27,00 (15,00; 33,00)	24,00(21,00;36,00)
CD3, %	<b>49,50 (42,50; 58,00)*</b>	<b>50,50 (41,00; 58,00)*</b>	53,00 (47,00; 60,00)	54,00 (44,00; 59,00)	56,00(53,00;59,00)
CD4, %	29,50 (19,00; 40,50)	28,00 (16,00; 37,00)	33,50 (23,00; 41,00)	31,50 (22,50; 44,50)	38,00(24,00;45,00)
CD8, %	24,00 (19,00; 30,00)	22,50 (19,00; 30,00)	27,00 (18,00; 32,00)	29,00 (23,00; 34,00)	22,00(19,00;32,00)
<b>CD16, %</b>	16,50 (10,00; 21,00)	13,00 (8,000; 21,00)	14,00 (9,00; 22,00)	<b>25,00 (17,50; 36,00)* **</b>	12,00(10,00;16,00)
<b>CD72, %</b>	<b>17,50 (14,00; 23,50)*</b>	<b>16,00 (14,00; 18,10)*</b>	<b>18,50 (14,00; 28,00)*</b>	<b>20,50 (18,50; 26,00)*</b>	11,00(10,00;15,00)
<b>CD25, %</b>	12,50 (8,00; 18,50)	14,00 (8,00; 20,00)	<b>18,00 (12,40; 24,50)* **</b>	<b>25,00 (15,00; 32,50)* **</b>	13,00 (8,00;16,00)
<b>CD95, %</b>	10,00 (6,00; 20,00)	10,00 (8,00; 18,00)	<b>21,00 (12,00; 31,00)* **</b>	<b>23,50 (13,00; 34,50)* **</b>	9,00 (7,00;11,00)
CD95L, %	21,00 (10,00; 37,00)	18,00 (9,00; 25,00)	23,50 (13,50; 40,00)	22,00 (11,00; 48,00)	17,00(12,00;21,00)
<b>HLA-DR, %</b>	27,00 (20,00; 36,00)	32,50 (22,50; 38,50)	<b>37,50 (27,00; 42,00)* **</b>	44,50 (24,00; 60,00)	29,00(25,00;34,00)
Лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	1,70 (1,34; 2,32)	1,74 (1,33; 2,56)	1,63 (1,32; 2,27)	1,62 (1,40; 1,65)	1,40 (0,76;1,87)
CD3, x10 <sup>9</sup> /л	0,92 (0,67; 1,16)	0,87 (0,55; 1,20)	0,78 (0,65; 1,30)	0,80 (0,66; 1,01)	0,78 (0,41;1,02)



Продолжение таблицы 16

1	2	3	4	5	6
CD4, $\times 10^9/\text{л}$	0,45 (0,24; 0,78)	0,37 (0,27; 0,72)	0,60 (0,44; 0,69)	0,63 (0,56; 0,96)	0,47 (0,22; 0,61)
CD8, $\times 10^9/\text{л}$	0,41 (0,24; 0,81)	0,39 (0,26; 0,53)	0,44 (0,27; 0,57)	0,55 (0,48; 0,76)	0,30 (0,15; 0,51)
CD4/CD8	1,20 (0,73; 1,60)	1,14 (0,76; 1,41)	1,39 (0,95; 1,58)	1,00 (0,82; 1,22)	1,19 (1,07; 1,46)
<b>CD16, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	0,21 (0,16; 0,46)	0,26 (0,15; 0,38)	0,26 (0,12; 0,34)	<b>0,68 (0,42; 0,91)* **</b>	0,14 (0,08; 0,29)
<b>CD72, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	<b>0,30 (0,18; 0,43)*</b>	<b>0,27 (0,19; 0,39)*</b>	<b>0,27 (0,19; 0,50)*</b>	<b>0,29 (0,28; 0,86)*</b>	0,13 (0,07; 0,26)
<b>CD25, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	0,23 (0,11; 0,36)	0,24 (0,13; 0,44)	0,30 (0,12; 0,58)	<b>0,52 (0,50; 0,56)*</b>	0,14 (0,09; 0,25)
<b>CD95, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	0,18 (0,10; 0,30)	<b>0,22 (0,13; 0,33)*</b>	<b>0,33 (0,18; 0,49)* **</b>	<b>0,62 (0,31; 0,73)* **</b>	0,11 (0,07; 0,20)
IgM, г/л	2,05 (1,50; 2,60)	<b>1,70 (1,40; 2,30)*</b>	<b>1,60 (1,20; 2,50)*</b>	2,15 (1,75; 3,95)	2,30 (1,70; 3,10)
IgG, г/л	<b>15,80 (12,30; 20,00)*</b>	14,30 (10,70; 21,00)	15,20 (10,60; 20,30)	<b>17,85 (15,30; 20,10)*</b>	12,40 (9,50; 16,55)
IgA, г/л	2,60 (1,90; 3,40)	2,40 (1,70; 2,70)	2,40 (1,60; 2,80)	2,95 (2,15; 3,50)	2,25 (1,80; 3,60)
<b>ЦИК, у.е.</b>	70,00 (40,00; 90,00)	70,00 (40,00; 90,00)	<b>80,00 (57,50; 107,50)*</b>	50,00 (40,00; 60,00)	60,00 (35,00; 75,00)
Комплемент, гем.ед.	87,10 (66,60; 104,10)	72,70 (58,30; 111,80)	85,01 (68,30; 104,20)	96,10 (72,20; 102,30)	42,25 (42,25; 42,25)
Пролиф. сп., имп/мин	3062,00 (2022,50; 4418,00)	2738,00 (1687,00; 4353,50)	2102,50 (1053,75; 3893,50)	4681,00 (740,00; 7885,00)	3051,00 (1631,00; 4457,00)
<b>Пролиф. ФГА, имп/мин</b>	25922,50 (12345,00; 43365,00)	<b>20123,50 (8420,00; 42131,50)*</b>	<b>9602,00 (5050,00; 32465,00)* **</b>	20274,00 (4087,00; 61935,00)	31837,00 (22023,0; 57041,00)
Пролиф. ЛПС, имп/мин	3371,00 (1657,00; 6156,00)	3107,00 (1675,50; 7226,50)	2890,00 (950,00; 7336,00)	3080,00 (2597,00; 6505,00)	2869,00 (2057,00; 4458,00)
<b>ИС ФГА, у.е.</b>	<b>9,68 (3,51; 13,51)*</b>	<b>7,64 (2,60; 14,57)*</b>	<b>4,21 (1,67; 15,95)*</b>	6,17 (1,78; 11,63)	13,87 (8,63; 16,88)
ИС ЛПС, у.е.	1,23 (0,76; 1,81)	1,24 (0,91; 2,00)	1,04 (0,69; 1,94)	1,02 (0,47; 2,60)	0,91 (0,81; 1,72)
<b>ФР, %</b>	<b>31,00 (19,00; 55,00)*</b>	<b>38,00 (20,00; 50,00)*</b>	<b>43,00 (20,00; 54,00)*</b>	<b>32,00 (28,00; 50,00)*</b>	17,00 (8,00; 29,50)
<b>ИРФР, у.е.</b>	<b>52,00 (26,00; 87,00)*</b>	<b>50,00 (28,00; 79,00)*</b>	<b>62,00 (33,00; 91,00)*</b>	<b>68,00 (58,00; 100,00)*</b>	23,50 (12,00; 45,50)
<b>СПФ, %</b>	4,00 (2,00; 11,00)	<b>6,00 (4,00; 16,00)**</b>	5,00 (2,00; 13,00)	5,00 (2,00; 7,00)	7,00 (4,00; 9,00)
<b>ИРСФ, у.е.</b>	4,00 (2,00; 12,00)	<b>6,00 (4,00; 17,00)**</b>	6,00 (2,00; 14,00)	5,00 (2,00; 7,00)	7,00 (4,00; 10,50)

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4	5	6
<b>TNF-<math>\alpha</math><sub>сп</sub>, пг/мл</b>	<b>213,50 (23,00; 855,00)*</b>	<b>92,00 (23,00; 291,00)*</b>	<b>113,50 (55,50; 549,70)*</b>	66,00 (30,00; 188,00)	15,65 (1,70; 52,00)
<b>TNF-<math>\alpha</math><sub>ст</sub>, пг/мл</b>	611,70 (130,00; 2709,00)	221,00 (133,00; 1301,00)	<b>823,00 (564,00; 2868,00)*</b>	146,00 (88,50; 657,00)	322,00 (94,00; 772,00)
<b>IL-1<sub>сп</sub>, пг/мл</b>	358,50 (132,00; 900,00)	270,00 (118,00; 2262,00)	236,000 (99,000; 1300,00)	70,00 (62,00; 1247,00)	344,50 (146,00; 1224,00)
<b>IL-1<sub>ст</sub>, пг/мл</b>	2130,50 (854,00; 6588,50)	1715,00 (230,00; 5461,00)	1666,50 (898,00; 2724,00)	1069,50 (58,00; 1559,00)	1716,00 (436,00; 3598,00)
<b>IFN-<math>\gamma</math><sub>сп</sub>, пг/мл</b>	180,00 (34,75; 521,00)	132,50 (25,50; 225,00)	135,00 (13,50; 657,00)	117,00 (22,75; 426,00)	82,75 (23,00; 138,75)
<b>IFN-<math>\gamma</math><sub>ст</sub>, пг/мл</b>	305,00 (145,00; 647,00)	387,00 (98,00; 1180,00)	252,50 (137,50; 692,00)	350,00 (120,50; 622,00)	598,00 (375,00; 3500,00)
<b>IL-2<sub>сп</sub>, пг/мл</b>	4,70 (0,00; 18,00)	20,00 (1,20; 106,30)	7,90 (0,00; 15,60)	0,00 (0,00; 14,60)	9,30 (0,00; 14,10)
<b>IL-2<sub>ст</sub>, пг/мл</b>	13,00 (0,00; 24,30)	17,90 (0,00; 140,00)	4,75 (0,00; 12,00)	12,80 (0,00; 187,80)	27,90 (0,00; 55,80)
<b>IL-10<sub>сп</sub>, пг/мл</b>	15,80 (4,30; 118,30)	37,65 (3,40; 213,80)	14,00 (0,00; 58,70)	32,70 (9,80; 229,50)	20,40 (4,80; 54,90)
<b>IL-10<sub>ст</sub>, пг/мл</b>	31,40 (11,10; 248,00)	167,85 (22,40; 330,60)	23,85 (14,60; 132,70)	60,20 (12,50; 77,10)	47,10 (14,20; 245,80)
<b>IL-4<sub>сп</sub>, пг/мл</b>	9,20 (2,10; 18,90)	<b>2,60 (0,20; 10,30)* **</b>	<b>1,50 (0,00; 14,20)* **</b>	12,80 (2,70; 17,60)	12,20 (9,90; 14,30)
<b>IL-4<sub>ст</sub>, пг/мл</b>	12,00 (3,20; 22,30)	<b>1,90 (0,00; 14,80)*</b>	<b>4,70 (0,00; 10,70)*</b>	6,70 (0,00; 18,15)	13,30 (12,40; 16,00)
<b>Относительное содержание МНПК с признаками апоптоза в ПК, %</b>	<b>30,00 (21,50; 40,50)*</b>	<b>28,00 (23,00; 39,00)*</b>	<b>35,00 (29,00; 38,00)*</b>	<b>22,00 (19,50; 48,00)*</b>	12,00 (8,00; 16,00)
<b>sFas, нг/мл</b>	32,45 (24,70; 43,65)	<b>27,00 (20,70; 30,20)*</b>	25,50 (22,80; 41,70)	35,80 (26,10; 68,20)	36,20 (30,25; 40,95)
<b>sFasL, нг/мл</b>	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)

Примечание:

\* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров ( $p < 0,05$ );\*\* – значимые различия с подгруппой больных без регионарных метастазов ( $N_0$ ) ( $p < 0,05$ );

n – количество обследованных.

У больных  $N_1$ - и  $N_2$ -степенью поражения лимфоузлов спонтанная и стимулированная ФГА продукция IL-4 была значимо ниже контрольных значений, при этом показатель спонтанной продукции этого цитокина в указанных группах был ниже, чем у больных без регионарных метастазов ( $p < 0,05$ ).

Процент МНПК с морфологическими признаками апоптоза был значимо выше контрольных значений во всех подгруппах больных. Концентрация растворимого Fas-рецептора у больных с  $N_1$ -степенью поражения лимфоузлов была ниже таковой здоровых доноров.

Выявленные нами особенности иммунного статуса, связанные с наличием или отсутствием регионарных метастазов, имели разнонаправленный характер.

Следует отметить параметры, в наибольшей степени сопряжённые с распространённостью регионарных метастазов. Так, например, спонтанная секреция TNF- $\alpha$  значимо превышала контрольные значения у больных всех групп ( $N_0$ - $N_2$ ), за исключением группы с максимальным метастатическим поражением регионарных лимфоузлов  $N_3$  (табл. 16). При этом у больных без регионарных метастазов наблюдалась максимальная спонтанная секреция TNF- $\alpha$ . Относительное количество CD3+-клеток (Т-лимфоциты) у больных без метастазов ( $N_0$ ) и с  $N_1$ -степенью поражения регионарных лимфоузлов было ниже показателей здоровых доноров (табл.16). Численные характеристики относительного количества CD3+-клеток у больных РМЖ несущественно отличались от уровня здоровых доноров (максимальная разница составляла 6%), однако при статистической обработке различия оказались достоверными. Максимальное количество естественных киллеров, активированных Т-клеток (CD25+) и лимфоцитов, готовых к апоптозу (CD95+), было зарегистрировано в группе больных с высокой степенью метастатического поражения регионарных лимфоузлов –  $N_3$  (табл. 16).

Известно, что при большинстве злокачественных опухолей (рак лёгкого, желудка, яичников, молочной железы, пищевода и др.)

увеличивается численность Treg-популяции до 12-21% [259]. Однако, необходимо отметить, что данное увеличение более характерно для больных с распространёнными формами заболевания, в то время, как на ранних стадиях увеличение количества Treg незначительно [34]. В то же время, при распространении опухоли и появлении метастазов в периферических лимфатических узлах уровень Treg значительно повышается [34]. В настоящем исследовании оценить роль T-регуляторных лимфоцитов не представлялось возможным, однако CD25 является одной из маркерных молекул T-регуляторных клеток, поэтому максимальное количество CD25+ клеток у больных с высокой степенью регионарного метастазирования, а также вышеуказанные данные литературы, позволяют нам косвенно предполагать, что увеличение численности данной субпопуляции лимфоцитов сопряжено с регионарным метастазированием.

В целом, анализируя результаты данного раздела работы, можно отметить, что с наличием регионарных метастазов ассоциируется активация и повышенная готовность к апоптозу лимфоцитов, а также высокое количество естественных киллерных клеток в крови. С сохранностью же регионарных лимфоузлов ассоциируется высокая спонтанная секреция TNF- $\alpha$  и низкое относительное количество циркулирующих в крови T-лимфоцитов

Однако не у всех больных с отсутствием регионарных метастазов происходила полная регрессия первичного опухолевого узла под влиянием НАХТ. У некоторых пациенток наблюдалась частичная регрессия, стабилизация или даже прогрессирование опухоли. Поэтому на следующем этапе анализа результатов обследования нами была произведена оценка иммунного статуса больных без метастазов с разной эффективностью НАХТ (табл. 17).

Было выявлено, что у больных с частичной регрессией первичной опухоли без метастазов относительное содержание CD3+ и HLA-DR+ клеток было ниже, тогда как абсолютное количество CD72+-лимфоцитов и показатели фагоцитарного резерва (ФР и ИРФР) – статистически значимо

выше показателей здоровых доноров. Концентрация IgG у больных с полной регрессией и стабилизацией опухоли была выше контроля, а ИС ФГА у пациенток с прогрессированием опухолевого процесса – ниже, чем у здоровых. Процентное содержание МНПК с признаками апоптоза было значимо повышено во всех подгруппах больных без метастазов.

Максимальный практический и научный интерес представляет группа больных с полной регрессией опухолевого узла и отсутствием метастазов в регионарных лимфоузлах ( $N_0$ ), так как характеризуется двумя потенциально благоприятными для результативного исхода НАХТ признаками, и, таким образом, иммунный статус этих пациенток должен отражать наиболее адекватный режим функционирования иммунной системы в плане прогноза эффективности НАХТ. Для характеристики этой группы важно сравнить иммунологические показатели, характеризующие данную группу, с показателями других групп, в особенности - с прогрессированием опухоли после НАХТ.

Мы выявили, что иммунный статус больных без метастазов с полной регрессией опухоли, оцененный до лечения, характеризовался смещением соотношения Т-лимфоцитов (CD4/CD8) в сторону CD8+-клеток, статистически значимо более высоким относительным количеством CD8+-лимфоцитов в сравнении с показателями больных с частичной регрессией и стабилизацией опухоли, а также максимальными значениями спонтанной и стимулированной секреции TNF- $\alpha$  и IL-1, спонтанной секреции IFN- $\gamma$  и стимулированной секреции IL-10 (табл. 17). Относительное же количество В-лимфоцитов (CD72+) у больных в группах со стабилизацией и прогрессированием опухолевого роста на фоне НАХТ значительно превышало аналогичные показатели здоровых доноров.

Таблица 17

**Иммунологические показатели больных РМЖ без регионарных метастазов (до лечения) в зависимости от эффективности НАХТ (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Показатель иммунного статуса	Степень поражения регионарных лимфоузлов				Здоровые доноры (n=24)
	Полная регрессия (n=6)	Частичная регрессия (n=23)	Стабилизация (n=14)	Прогрессирование (n=5)	
1	2	3	4	5	6
CD3 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	45,50(43,00;59,00)	<b>48,50(40,00;59,00)*</b>	51,50(49,00;57,00)	49,00(43,00;61,00)	56,00(53,00;59,00)
CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	32,00(26,00;39,00)	<b>22,50(18,00;28,00)**</b>	<b>22,50(17,00;29,00)**</b>	35,00(22,00;40,00)	22,00(19,00;32,00)
CD72 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	19,55(14,00;28,00)	14,00(11,00;18,00)	<b>20,50(16,00;27,00)*</b>	<b>24,00(15,00;33,00)*</b>	11,00(10,00;15,00)
HLA-DR <sup>+</sup> -лимфоциты, %	29,00(27,00;31,00)	<b>25,00(18,00;29,00)*</b>	36,00(26,00;42,00)	23,00(15,00;36,00)	29,00(25,00;34,00)
CD4/CD8	<b>0,77(0,73;0,87)*</b>	1,32(0,83;1,95)	1,28(0,91;1,93)	1,05(0,62;1,20)	1,19 (1,07;1,46)
CD72 <sup>+</sup> -лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	0,40(0,27;0,75)	<b>0,27(0,18;0,35)*</b>	0,28(0,16;0,38)	0,44(0,29;0,51)	0,13 (0,07;0,26)
IgG, г/л	<b>21,25(16,60;26,00)*</b>	13,70(11,70;20,00)	<b>17,60(14,30;20,10)*</b>	13,50(13,00;15,80)	12,40 (9,50;16,55)
ИС ФГА, у.е.	11,45(10,26;11,57)	6,91(2,32; 14,35)	6,10(5,11;21,66)	<b>9,68(4,08;10,08)*</b>	13,87 (8,63;16,88)
ФР, %	20,00(11,00;34,00)	<b>32,00(18,00;62,00)*</b>	29,00(26,00;39,00)	46,00(25,00;53,00)	17,00 (8,00;29,50)
ИРФР, у.е.	28,50(11,00;35,00)	<b>71,00(24;90,00)* **</b>	47,00(28,00;72,00)	52,00(35,00;69,00)	23,50 (12,00;45,50)
TNF-α <sub>сп</sub> , пг/мл	<b>3140 (558,5;8950,0)*</b>	<b>62,00(1,65;567,50)**</b>	<b>235,00(131,30;929)*</b>	<b>17,00(1,50;57,00)**</b>	15,65 (1,70;52,00)
TNF-α <sub>ст</sub> , пг/мл	<b>9550,00(1000;9550)*</b>	281,20(124,0;2709,0)	842,20(317;1748,00)	<b>190,00(34;589,00)**</b>	322,00(94,00;772,00)
IL-1 <sub>сп</sub> , пг/мл	<b>5528,00(784;9272)*</b>	<b>293(139,5;1120,0)**</b>	<b>175,00(119;665)**</b>	535,00(387;4999,00)	344,50(146,0;1224,0)
IL-1 <sub>ст</sub> , пг/мл	<b>8251,50(7003;9500)*</b>	4114,00(655;7287,0)	1351,00(330;2910,0)	1206,00(892;6174,0)	1716,00(436;3598,0)
IFN-γ <sub>сп</sub> , пг/мл	<b>271,00(190,00;362)*</b>	114,00(12,00;642,00)	170,00(115;810,00)	<b>19,50(17,5;21,50)**</b>	82,75 (23,00;138,75)
IL-10 <sub>ст</sub> , пг/мл	248,00(21,30;447,10)	86,15(32,75;639,30)	8,60(2,90;56,00)	<b>11,40(11,10;14,0)**</b>	47,10 (14,20;245,80)
Относительное содержание МНПК с признаками апоптоза в ПК, %	<b>23,00(19,00;53,00)*</b>	<b>32,50(24,00;46,50)*</b>	<b>29,00(22,00;38,50)*</b>	<b>29,00(25,00;30,00)*</b>	12,00 (8,00;16,00)

Примечание:

\* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05);

\*\* – значимые различия с подгруппой больных с полной регрессией опухоли (p<0,05);

n – количество обследованных;

Таким образом, группа с отсутствием метастазов до начала лечения и полной регрессией опухоли на фоне НАХТ имела особенности иммунного статуса, выразившиеся в смещении баланса субпопуляций лимфоцитов в сторону преобладания Т-цитотоксических (CD8+), а также характеризовалась значительно более высоким уровнем спонтанной и стимулированной секреции как про-, так и противовоспалительных цитокинов, средние значения которых, зачастую, существенно превышали уровни здоровых и/или показатели больных в группах, не достигших полной регрессии первичной опухоли на фоне НАХТ (табл. 17).

### **3.7. Особенности иммунологических показателей больных РМЖ в зависимости от наличия клинических проявлений различных иммунопатологических синдромов**

Наличие какого-либо иммунопатологического синдрома (иммунодефицита, аллергологического, аутоиммунного) мы оценивали, анализируя клинические и анамнестические данные пациентов, полученные на этапе анкетирования [18].

При анализе анамнестических данных было выявлено, что у больных с полной регрессией опухоли реже выявлялись клинические проявления иммунодефицита, основным маркером которого является инфекционный синдром ( $p=0,04$ ) (табл. 18), а среди больных с полной регрессией практически отсутствовали больные с наличием анамнестических признаков иммунопатологических синдромов (табл. 18).

При анализе иммунного статуса больных с наличием анамнестически выявленного инфекционного синдрома, с учетом регистрации клинических признаков недостаточности гуморального, клеточного звена и комбинированной недостаточности двух звеньев иммунитета, были выявлены лишь высокие значения ЦИК в сравнении с группой без инфекционной иммунопатологии (табл. 19).

Таблица 18

**Частота анамнестически выявленных иммунопатологических синдромов у больных РМЖ с различной эффективностью НАХТ (n, %)**

Имунопатологический синдром	Наличие иммунопатологического синдрома	Полная регрессия опухоли		Уровень значимости различий (p)	Прогрессирование опухолевого процесса		Уровень значимости различий (p)
		Наличие, %(n)	Отсутствие, %(n)		Наличие, %(n)	Отсутствие, %(n)	
	Выявлен	40(2)	76(50)	0,08	57(4)	75(48)	0,31
	Не выявлен	60(3)	24(16)		43(3)	25(16)	
Аутоиммунный	Выявлен	0(0)	21(14)	0,25	14 (1)	20 (13)	0,7
	Не выявлен	100(5)	79(52)		86 (6)	80 (51)	
Аллергический	Выявлен	20(1)	36(24)	0,46	43(3)	34(22)	0,66
	Не выявлен	80(4)	64(42)		57(4)	66(42)	
<b>Иммунодефицит (инфекционный синдром)</b>	<b>Выявлен</b>	<b>20(1)</b>	<b>67(46)</b>	<b>0,04</b>	43(3)	66(44)	0,22
	<b>Не выявлен</b>	<b>80(4)</b>	<b>33(20)</b>		57(4)	34(20)	
Недостаточность клеточного и гуморального звена	Выявлен	20(1)	29(19)	0,67	14(1)	30(19)	0,39
	Не выявлен	80(4)	71(47)		86(6)	70(45)	
Недостаточность гуморального звена	Выявлен	0(0)	30(20)	0,15	29(2)	28(18)	,98
	Не выявлен	100(5)	70(46)		71(5)	72(46)	
Недостаточность клеточного звена	Выявлен	0(0)	8(5)	0,52	0(0)	8(5)	0,44
	Не выявлен	100(5)	92(61)		100(7)	92(59)	



Также отсутствовали статистически значимые различия между группой больных, у которых анамнестически был выявлен комбинированный иммунодефицит, при сравнении с пациентками с отсутствием данной иммунопатологии.

Таблица 19

**Иммунологические показатели больных РМЖ до лечения в зависимости от наличия анамнестически выявленных иммунопатологических синдромов (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

<b>Иммунодефицит (инфекционный синдром)</b>		
Показатель иммунного статуса	Отсутствие	Наличие
ЦИК, у.е.	45,00(40,00;70,00)	80,00(60,00;100,00)*
<b>Недостаточность гуморального звена</b>		
Показатель иммунного статуса	Отсутствие	Наличие
CD3 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	50,00(40,00;57,00)	56,00(45,50;61,00)*
CD16 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	13,00(8,00;18,00)	19,50(13,50;24,50)*
CD95 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	9,00(7,00;15,00)	13,00(9,00;22,50)*
CD95 <sup>+</sup> -лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	0,18(0,11;0,23)	0,27(0,19;0,49)*
IgA, г/л	2,60(2,00;3,20)	2,20(1,60;2,50)*
ИС ФГА, у.е.	2,60(1,54;9,14)	6,44(4,13;11,63)*
sFas, нг/мл	27,10(22,80;37,90)	41,80(37,70;856,90)*
<b>Недостаточность клеточного звена</b>		
Показатель иммунного статуса	Отсутствие	Наличие
Лейкоциты, x10 <sup>9</sup> /л	6,50(5,50;7,30)	4,20(3,90;5,20)*
CD72 <sup>+</sup> -лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	0,36(0,24;0,47)	0,18(0,18;0,22)*
Относительное содержание МНПК с признаками апоптоза в ПК, %	30,00(23,00;40,00)	48,00(38,00;51,00)*

Примечание: \*- статистически значимые различия (p<0,05) между группами пациентов с наличием и отсутствием объективного ответа на НАХТ.

Максимальное количество значимых различий между показателями иммунограммы было выявлено при сравнении групп больных РМЖ с наличием и отсутствием клинических проявлений инфекционного синдрома с признаками недостаточности гуморального звена иммунитета. Иммунный статус группы больных с анамнестическими признаками недостаточности гуморального звена в сравнении с больными, у которых данная иммунопатология не была выявлена, характеризовался более высоким

относительным количеством Т-лимфоцитов (CD3+), NK-клеток (CD16+), относительным и абсолютным числом CD95+-лимфоцитов, ИС ФГА и растворимого Fas-рецептора и низкой концентрацией IgA (табл. 19).

Повышенная готовность лимфоцитов к апоптозу (экспрессия CD95) в сочетании с более высоким уровнем растворимого Fas-рецептора может свидетельствовать как об укорочении времени жизни иммуноцитов у данных пациенток, так и об активации клеточных механизмов иммунитета (CD95-рецептор является также маркером активации) на фоне ослабления гуморального звена.

У больных с анамнестически выявленными признаками дефицита Т-клеточного звена абсолютное количество лейкоцитов и В-лимфоцитов (CD72+) было ниже, а процентное содержание МНПК с морфологическими признаками апоптоза – выше, чем у пациенток без данной иммунопатологии (табл. 19).

Особенности показателей иммунного статуса групп больных с наличием или отсутствием ИПС являются подтверждением целесообразности использования анамнестического подхода для назначения комплекса лабораторных методов иммунологического обследования. Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения взаимосвязи анамнестических данных с результативностью противоопухолевой терапии.

Определенный режим функционирования иммунной системы больных РМЖ при наличии одного и того же ИПС в анамнезе может быть как следствием опухолевого процесса, так и являться фоном для развития опухоли. Однако дальнейшее выявление закономерностей изменения параметров иммунной системы в процессе развития опухоли и на разных этапах противоопухолевого лечения позволит в будущем прогнозировать эффективность лечения и корректировать этот прогноз на всех этапах наблюдения за пациентами.

### 3.8. Изменение параметров иммунитета после НАХТ

Анализируя средневыворочные значения показателей иммунограмм всей когорты больных РМЖ после НАХТ, мы зарегистрировали ряд особенностей. Процентное содержание CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, соотношение CD4/CD8, концентрация IgM, стимулированная ФГА пролиферативная способность лимфоцитов и ИС ФГА были достоверно снижены, а ФР, ИРФР, спонтанная секреция TNF- $\alpha$ , IL-1 и IL-2 и процент МНПК с морфологическими признаками апоптоза – статистически значимо повышены относительно значений соответствующих показателей здоровых доноров.

Таблица 20

#### Иммунологические показатели больных РМЖ (после 2 курсов НАХТ) и здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])

Показатели иммунного статуса	Больные РМЖ (n=131)	Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)
1	2	3	4
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	5,70 (4,30; 7,10)	5,40 (4,20; 6,40)	0,47
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,00 (0,00; 2,00)	1,00 (0,00; 3,00)	0,51
Сегментоядерные нейтрофилы, %	60,50 (55,00; 67,00)	58,00 (51,00; 67,00)	0,54
Эозинофилы, %	2,00 (1,00; 4,00)	3,00 (1,00; 4,00)	0,79
Базофилы, %	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 1,00)	0,35
Моноциты, %	7,00 (5,00; 10,00)	6,00 (4,00; 8,00)	0,11
<b>Лимфоциты, %</b>	<b>27,00 (21,00; 33,00)**</b>	<b>24,00(21,00;36,00)</b>	<b>0,93</b>
<b>CD3<sup>+</sup>-лимфоциты, %</b>	<b>50,50 (44,00; 59,00) *</b>	<b>56,00(53,00;59,00)</b>	<b>0,02</b>
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	28,00 (16,00; 37,00)	38,00(24,00;45,00)	0,06
CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	27,00 (21,00; 33,00)	22,00(19,00;32,00)	0,42
CD16 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	15,00 (10,00; 19,00)	12,00(10,00;16,00)	0,20
CD72 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	15,00 (9,00; 21,00)	11,00(10,00;15,00)	0,35
CD25 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	13,00 (9,00; 19,50)	13,00 (8,00;16,00)	0,55
CD95 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	12,00 (7,00; 17,50)	9,00 (7,00;11,00)	0,05
CD95L <sup>+</sup> -лимфоциты, %	15,00 (9,00; 27,00)	17,00(12,00;21,00)	0,91
HLA-DR <sup>+</sup> -лимфоциты, %	31,00 (23,00; 41,00)	29,00(25,00;34,00)	0,47
<b>Лимфоциты, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	<b>1,51 (1,15; 1,88)**</b>	<b>1,40 (0,76;1,87)</b>	<b>0,49</b>
<b>CD3<sup>+</sup>-лимфоциты, <math>\times 10^9/\text{л}</math></b>	<b>0,73 (0,50; 0,99)**</b>	<b>0,78 (0,41;1,02)</b>	<b>0,62</b>
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,36 (0,21; 0,52)	0,47 (0,22;0,61)	0,40
CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,40 (0,28; 0,56)	0,30 (0,15;0,51)	0,26
<b>CD4/CD8</b>	<b>0,89 (0,59; 1,25)** *</b>	<b>1,19 (1,07;1,46)</b>	<b>0,02</b>

## Продолжение таблицы 20

CD16 <sup>+</sup> -лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	0,23 (0,13; 0,32)	0,14 (0,08;0,29)	0,15
CD72 <sup>+</sup> -лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	0,21 (0,13; 0,35)	0,13 (0,07;0,26)	0,05
CD25 <sup>+</sup> -лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	0,18 (0,12; 0,34)	0,14 (0,09;0,25)	0,16
CD95 <sup>+</sup> -лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	0,16 (0,09; 0,28)	0,11 (0,07;0,20)	0,11
<b>IgM, г/л</b>	<b>1,70 (1,30; 2,30) *</b>	<b>2,30 (1,70; 3,10)</b>	<b>0,006</b>
IgG, г/л	14,90 (10,00; 22,60)	12,40 (9,50; 16,55)	0,09
IgA, г/л	2,50 (1,50; 3,20)	2,25 (1,80; 3,60)	0,48
ЦИК, у.е.	70,00 (40,00; 90,00)	60,00 (35,00; 75,00)	0,24
Комплемент, гем.ед.	72,70 (62,17; 99,05)	42,25 (42,25; 42,25)	1,00
Пролиф. сп., имп/мин	2743,00 (1480,00; 4704,00)	3051,00 (1631,00; 4457,00)	0,88
<b>Пролиф. ФГА, имп/мин</b>	<b>24052,00 (5687,00; 34762,00) *</b>	<b>31837,00 (22023,0; 57041,00)</b>	<b>0,01</b>
Пролиф. ЛПС, имп/мин	3219,50 (1785,00; 6003,00)	2869,00 (2057,00; 4458,00)	0,87
<b>ИС ФГА, у.е.</b>	<b>7,38 (1,93; 13,04) *</b>	<b>13,87 (8,63; 16,88)</b>	<b>0,005</b>
ИС ЛПС, у.е.	1,01 (0,63; 1,68)	0,91 (0,81; 1,72)	0,90
<b>ФР, %</b>	<b>30,00 (15,00; 51,00) *</b>	<b>17,00 (8,00; 29,50)</b>	<b>0,02</b>
<b>ИРФР, у.е.</b>	<b>44,00 (20,00; 80,00) *</b>	<b>23,50 (12,00; 45,50)</b>	<b>0,04</b>
СПФ, %	6,00 (3,00; 12,00)	7,00 (4,00; 9,00)	0,70
ИРСПФ, у.е.	6,00 (3,00; 12,00)	7,00 (4,00; 10,50)	0,60
<b>TNF-α<sub>сп</sub>, пг/мл</b>	<b>191,00(18,00; 510,00)*</b>	<b>15,65 (1,70; 52,00)</b>	<b>0,001</b>
TNF-α <sub>ст</sub> , пг/мл	640,00 (145,00; 1430,00)	322,00 (94,00; 772,00)	0,15
<b>IL-1<sub>сп</sub>, пг/мл</b>	<b>918,50 (251,00; 3985,00) *</b>	<b>344,50(146,00;1224,00)</b>	<b>0,04</b>
IL-1 <sub>ст</sub> , пг/мл	3715,00 (1119,00; 7223,00)	1716,00 (436,00; 3598,00)	0,06
IFN-γ <sub>сп</sub> , пг/мл	135,00 (12,50; 608,00)	82,75 (23,00; 138,75)	0,10
IFN-γ <sub>ст</sub> , пг/мл	750,50 (174,00; 1334,50)	598,00 (375,00; 3500,00)	0,38
<b>IL-2<sub>сп</sub>, пг/мл</b>	<b>21,85 (5,50; 29,75) *</b>	<b>9,30 (0,00; 14,10)</b>	<b>0,02</b>
IL-2 <sub>ст</sub> , пг/мл	25,80 (4,40; 78,90)	27,90 (0,00; 55,80)	0,57
IL-10 <sub>сп</sub> , пг/мл	32,10 (7,80; 152,25)	20,40 (4,80; 54,90)	0,30
IL-10 <sub>ст</sub> , пг/мл	100,20 (29,10; 205,50)	47,10 (14,20; 245,80)	0,82
IL-4 <sub>сп</sub> , пг/мл	7,60 (2,70; 17,60)	12,20 (9,90; 14,30)	0,09
<b>IL-4<sub>ст</sub>, пг/мл</b>	<b>13,20 (4,75; 22,10)**</b>	<b>13,30 (12,40; 16,00)</b>	<b>0,39</b>
<b>Относительное содержание МНПК с признаками апоптоза в ПК, %</b>	<b>34,00 (23,00; 43,00) *</b>	<b>12,00 (8,00; 16,00)</b>	<b>0,00</b>
<b>sFas, нг/мл</b>	<b>39,60 (32,70; 64,50)**</b>	<b>36,20 (30,25; 40,95)</b>	<b>0,27</b>
sFasL, нг/мл	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	1,00

Примечание: здесь и в табл. 21: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05); \*\* – значимые различия в сравнении с уровнем показателя до начала лечения (p<0,05).

В сравнении с уровнями анализируемых показателей, оцененными до лечения, после НАХТ произошло статистически значимое снижение

относительного и абсолютного количества лимфоцитов, абсолютного количества CD3+-клеток, иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8), а также повышение стимулированной ФГА секреции ИЛ-4 и концентрации растворимого Fas-рецептора в сыворотке.

Оценивая изменения изучаемых параметров после проведения НАХТ, мы отметили, что их динамика имела разнонаправленный характер, при этом межгрупповые различия между целым рядом иммунологических показателей, выявленные нами до лечения, нивелировались, и значения приблизились к показателям группы здоровых (табл. 21-27).

У больных с полной регрессией первичного опухолевого узла абсолютное количество лейкоцитов стало достоверно низким в сравнении с показателями остальных подгрупп больных и здоровых доноров.

Таблица 21

**Показатели гемограммы больных РМЖ после 2 курсов НАХТ и здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Абсолютное и относительное количество лейкоцитов в ПК	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4	5			
Лейкоциты, x10 <sup>9</sup> /л	<b>3,20</b> ( <b>2,65;</b> <b>3,80</b> )* **	6,20 (4,90; 8,30)	<b>5,70</b> ( <b>4,30;</b> <b>6,40</b> ) **	6,10 (5,70; 7,20)	5,40 (4,20; 6,40)	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,01</b>
Палочко-ядерные нейтрофилы, %	2,00 (2,00; 2,00)	1,00 (0,00; 1,00)	2,00 (0,00; 4,00)	1,00 (1,00; 2,00)	1,00 (0,00; 3,00)	1,00	1,00	1,00
Сегментоядерные нейтрофилы, %	50,50 (45,50; 57,50)	64,00 (58,50; 69,50)	60,00 (54,00; 65,00)	58,00 (44,00; 70,00)	58,00 (51,00; 67,00)	<b>0,03</b>	0,14	0,45
Эозинофилы, %	4,00 (4,00; 4,00)	2,00 (1,00; 4,00)	2,00 (1,00; 4,00)	3,00 (3,00; 11,00)	3,00 (1,00; 4,00)	0,27	0,19	0,54
Базофилы, %	1,00 (1,00; 1,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 1,00)	1,00	1,00	1,00
Моноциты, %	10,50 (7,00; 12,00)	6,00 (5,00; 9,50)	<b>9,00</b> ( <b>6,00;</b> <b>10,00</b> ) *	6,00 (4,00; 7,00)	6,00 (4,00; 8,00)	0,16	0,41	0,18

В динамике абсолютное число лейкоцитов значительно снизилось после НАХТ в сравнении с исходным уровнем у пациенток с полной регрессией и стабилизацией опухоли. Был зарегистрирован более низкий уровень сегментоядерных нейтрофилов в сравнении с показателем пациенток с частичной регрессией опухоли (табл. 21). Относительное количество моноцитов у больных со стабилизацией опухоли было значительно выше показателей здоровых доноров.

При анализе межгрупповых различий после лечения было зарегистрировано более высокое относительное содержание лимфоцитов у больных с полной регрессией опухоли в сравнении с аналогичным показателем пациенток с частичной регрессией. У больных со стабилизацией опухолевого процесса в динамике наблюдалось снижение относительного количества CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, и после НАХТ регистрировались более высокие значения CD95<sup>+</sup>-субпопуляции лимфоцитов, а также достоверно низкое значение иммунорегуляторного индекса в сравнении с контрольной группой (табл. 22).

Абсолютное количество CD72<sup>+</sup>-клеток в сравнении с показателями здоровых доноров было повышено после НАХТ у больных с прогрессированием опухолевого процесса (табл. 22).

Концентрация IgM в сыворотке крови больных РМЖ после проведения НАХТ была ниже контрольных значений во всех группах больных, за исключением пациенток с полной регрессией опухоли. Уровень IgG у больных с полной регрессией оставался значительно выше контрольного значения (табл. 23). По уровню ЦИК и активности комплемента статистически значимых отличий в сравнении с показателями здоровых доноров и между подгруппами больных выявлено не было.

Таблица 22

**Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови  
у больных РМЖ после 2 курсов НАХТ и у здоровых доноров (Ме[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Относительное и абсолютное содержание лимфоцитов в ПК	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4	5			
Лимфоциты, %	35,50(29,00;43,50)	<b>24,00(21,00;30,00)**</b>	27,00(21,00;32,00)	27,00 (23,00;33,00)	24,00(21,00;36,00)	<b>0,04</b>	0,10	0,11
CD3, %	50,00(40,00;59,00)	53,00 (45,50;60,00)	<b>48,00(40,00;57,00)*</b>	52,00 (43,00;56,00)	56,00(53,00;59,00)	0,35	0,92	0,62
CD4, %	28,00(13,00;35,00)	28,00 (19,50;42,50)	<b>22,00(13,00;34,00)*</b>	27,00 (13,00;46,00)	38,00(24,00;45,00)	0,37	0,83	0,73
CD8, %	25,00(16,00;33,00)	<b>28,00(21,50;32,50)**</b>	26,00 (20,50;33,00)	27,50 (17,00;36,00)	22,00(19,00;32,00)	0,53	0,80	0,66
CD16, %	16,00(10,00;23,00)	14,50 (9,50;18,00)	16,00 (11,00;21,00)	14,00 (8,00;17,00)	12,00(10,00;16,00)	0,37	0,75	0,49
CD72, %	9,00 (7,00;28,00)	16,00 (10,00;21,00)	13,00 (9,00;21,00)	17,00 (14,00;28,00)	11,00(10,00;15,00)	0,65	0,75	0,33
CD25, %	9,00 (7,00;20,00)	14,00 (9,00;20,00)	13,00 (9,00;19,00)	15,00 (8,00;18,00)	13,00 (8,00;16,00)	0,40	0,35	0,49
CD95, %	12,00 (6,00;37,00)	11,00 (6,00;18,00)	<b>13,00 (7,00;16,00)*</b>	13,00 (4,00;21,00)	9,00 (7,00;11,00)	0,62	0,83	0,38
CD95L, %	19,50(13,00;27,00)	17,00 (11,00;26,00)	13,00 (8,00;27,00)	19,00 (11,00;35,00)	17,00(12,00;21,00)	0,63	0,26	0,96
HLA-DR, %	34,50(13,00;47,00)	33,00 (25,00;42,00)	29,00 (23,00;39,00)	26,00 (18,00;38,00)	29,00(25,00;34,00)	0,73	0,85	0,68
Лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	<b>1,13 (0,83;1,65) **</b>	1,66 (1,25;1,89)	<b>1,37 (0,99;1,79) **</b>	1,57 (1,52;1,88)	1,40 (0,76;1,87)	0,23	0,35	0,19
CD3, x10 <sup>9</sup> /л	<b>0,54 (0,41;0,93) **</b>	0,75 (0,59;1,05)	0,65 (0,36;0,82)	0,83 (0,80;0,97)	0,78 (0,41;1,02)	0,31	0,86	0,45
CD4, x10 <sup>9</sup> /л	0,37 (0,24;0,61)	0,41 (0,27;0,59)	0,31 (0,18;0,46)	0,36 (0,20;0,51)	0,47 (0,22;0,61)	0,66	0,54	0,85
CD8, x10 <sup>9</sup> /л	<b>0,27 (0,14;0,51) **</b>	0,46 (0,31;0,59)	0,39 (0,22;0,51)	0,37 (0,28;0,62)	0,30 (0,15;0,51)	0,18	0,58	0,34
CD4/CD8	0,86 (0,52;1,31)	0,98 (0,71;1,29)	<b>0,78 (0,47;1,23)* **</b>	1,13 (0,54;1,62)	1,19 (1,07;1,46)	0,58	0,42	0,85
CD16, x10 <sup>9</sup> /л	0,16 (0,13;0,34)	0,22 (0,15;0,32)	0,23 (0,13;0,30)	0,23 (0,10;0,32)	0,14 (0,08;0,29)	0,70	0,81	0,85
CD72, x10 <sup>9</sup> /л	0,25 (0,10;0,41)	0,24 (0,16;0,35)	0,18 (0,13;0,30)	<b>0,36 (0,21;0,61)*</b>	0,13 (0,07;0,26)	0,70	0,72	0,26
CD25, x10 <sup>9</sup> /л	<b>0,15 (0,10;0,21) **</b>	0,18 (0,15;0,34)	0,18 (0,11;0,34)	0,23 (0,10;0,39)	0,14 (0,09;0,25)	0,25	0,52	0,26
CD95, x10 <sup>9</sup> /л	0,14 (0,08;0,27)	0,14 (0,10;0,24)	0,15 (0,09;0,29)	0,30 (0,08;0,42)	0,11 (0,07;0,20)	0,70	0,86	0,57

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05); \*\* – значимые различия в сравнении с уровнем показателя до начала лечения (p<0,05); n – количество обследованных.

**Таблица 23**

**Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови больных РМЖ  
после 2 курсов НАХТ и здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4				
IgM, г/л	2,00 (1,34; 3,10)	<b>1,60</b> <b>(1,30;</b> <b>2,50)*</b>	<b>1,70</b> <b>(1,20;</b> <b>2,20)*</b>	<b>1,30</b> <b>(1,10;</b> <b>2,00)*</b>	2,30 (1,70; 3,10)	0,52	0,29	0,17
IgG, г/л	<b>18,40</b> <b>(14,80;</b> <b>19,90)*</b>	14,10 (10,50; 23,40)	14,40 (8,40; 22,70)	14,50 (11,60; 17,50)	12,40 (9,50; 16,55)	0,55	0,69	0,33
IgA, г/л	2,80 (2,10; 6,90)	2,40 (1,50; 3,70)	2,20 (1,20; 3,00)	2,65 (1,30; 3,80)	2,25 (1,80; 3,60)	0,24	0,14	0,46

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05).

**Таблица 24**

**Спонтанная, стимулированная ФГА и ЛПС пролиферативная  
активность мононуклеаров периферической крови у больных РМЖ  
после 2 курсов НАХТ и у здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Пролиферативная активность МНПК	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4				
Спонтанная, имп/мин	3642,00 (1100,00; 4898,00)	2743,00 (1666,00; 5269,00)	3389,00 (1365,00; 4704,00)	2366,00 (1125,00; 2604,00)	3051,00 (1631,00; 4457,00)	0,94	1,00	0,35
Стимулированная ФГА, имп/мин	<b>11340,50</b> <b>(7282,00;</b> <b>13208,0)*</b>	<b>24162,50</b> <b>(8135,00;</b> <b>34762,0)*</b>	<b>24052,00</b> <b>(5546,00;</b> <b>34788,0)*</b>	28359,00 (6768,00; 44675,00)	31837,00 (22023,0; 57041,00)	0,23	0,38	0,35
Стимулированная ЛПС, имп/мин	3918,50 (842,00; 6003,00)	2752,00 (1764,50; 7245,50)	3392,00 (1967,00; 5785,00)	2195,00 (1623,00; 5307,00)	2869,00 (2057,00; 4458,00)	0,97	0,89	0,72
ИС ФГА, у.е.	<b>4,49</b> <b>(1,48;</b> <b>7,86)*</b>	<b>7,71</b> <b>(2,02;</b> <b>15,44)*</b>	<b>5,61</b> <b>(1,93;</b> <b>14,48)*</b>	8,44 (7,46; 13,04)	13,87 (8,63; 16,88)	0,38	0,51	0,24
ИС ЛПС, у.е.	1,10 (0,61; 1,33)	0,95 (0,62; 1,60)	1,03 (0,67; 1,90)	1,26 (0,63; 1,40)	0,91 (0,81; 1,72)	0,97	0,54	0,72

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05).



ФГА-индуцированная пролиферативная активность лимфоцитов и ИС ФГА были достоверно снижены относительно результатов обследования группы контроля во всех подгруппах больных, за исключением подгруппы пациенток с прогрессированием опухолевого процесса (табл. 24). Несмотря на то, что значения медиан указанных выше показателей у больных с прогрессированием превышали таковые до лечения, значимых различий между ними не было зарегистрировано.

Такие показатели, как ФР и ИРФР были выше контрольного уровня лишь у больных с частичной регрессией (табл. 25).

Таблица 25

**Активность кислородозависимых механизмов биоцидности  
гранулоцитов периферической крови у больных РМЖ после 2 курсов  
НАХТ и у здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Показатели кислородзависимой микробицидной активности нейтрофилов	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4				
ФР, %	26,00 (18,00; 30,00)	<b>35,00</b> <b>(18,00;</b> <b>58,00)*</b>	28,00 (11,00; 50,00)	36,00 (16,00; 50,00)	17,00 (8,00; 29,50)	0,27	0,77	0,63
ИРФР, у.е.	30,00 (24,00; 54,00)	<b>55,00</b> <b>(22,00;</b> <b>89,00)*</b>	38,00 (14,00; 67,00)	54,00 (20,00; 91,00)	23,50 (12,00; 45,50)	0,20	0,96	0,38
СПФ, %	9,00 (4,00; 20,00)	8,00 (3,00; 14,00)	4,00 (2,00; 7,00)	10,00 (6,00; 12,00)	7,00 (4,00; 9,00)	0,82	0,20	0,66
ИРСПФ, у.е.	9,00 (4,00; 22,00)	8,00 (3,00; 14,00)	5,00 (2,00; 7,00)	10,00 (6,00; 12,00)	7,00 (4,00; 10,50)	0,86	0,21	0,73

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05).

Более высокий уровень спонтанной секреции TNF-α, в сравнении с группой контроля, наблюдался у больных с полной и частичной регрессией опухоли после НАХТ (табл. 26). У больных с полной регрессией также была зарегистрирована достоверно высокая в сравнении с группой здоровых

спонтанная секреция IL-1. Спонтанная секреция IFN- $\gamma$  была выше у больных с частичной регрессией опухоли (в сравнении с показателями здоровых доноров), причём у пациенток с наличием ответа на НАХТ было зарегистрировано повышение спонтанной секреции IFN- $\gamma$  в сравнении с контролем (160,00 [75,00;608,00] против 82,75 [23,00;138,75] ( $p < 0,05$ )).

У больных с прогрессированием опухолевого процесса были зафиксированы более низкие уровни спонтанной и стимулированной ФГА секреции IL-4 в сравнении с контролем. У больных с отсутствием объективного ответа на НАХТ возросла спонтанная секреция IL-2 в сравнении с показателями здоровых доноров (23,25 [15,00;29,70] и 9,30 [0,00;14,10] соответственно ( $p < 0,05$ )). Спонтанная секреция IL-10 у больных с полной регрессией была выше, чем в группе здоровых доноров, однако уровень значимости не достиг достоверного значения ( $p = 0,06$ ). При этом корреляционный анализ показал, что прямая корреляционная связь спонтанной секреции IL-10 с эффективностью НАХТ сохранилась и после лечения (см. раздел 3.3., рис. 8).

После проведения 2 курсов НАХТ во всех группах больных количество мононуклеаров с морфологическими признаками апоптоза достоверно превышало аналогичный показатель здоровых доноров (табл. 27). У больных со стабилизацией опухолевого процесса концентрация растворимого Fas-рецептора в сыворотке значимо повысилась после НАХТ в сравнении со значением данного показателя до начала лечения (табл. 27). К сожалению, в нашем исследовании по техническим причинам не представлены результаты выявления растворимых Fas-рецептора и Fas-лиганда у пациенток с полной регрессией. Однако у больных с отсутствием объективного ответа на НАХТ повысилась концентрация сывороточного Fas-рецептора (41,55 [30,50;64,50] против 29,10 [22,80;42,90] до лечения ( $p < 0,05$ )), который рассматривается как фактор, препятствующий апоптозу опухолевых клеток.

**Спонтанная и стимулированная секреция цитокинов у больных РМЖ  
после 2 курсов НАХТ и у здоровых доноров (Ме[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Концентрация цитокинов	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4				
TNF- $\alpha$ <sub>сп</sub> , пг/мл	<b>256,00 (94,00; 1410,00)*</b>	<b>227,50 (44,00; 496,00)*</b>	77,00 (3,00; 655,00)	242,50 (118,00; 270,00)	15,65 (1,70; 52,00)	0,75	0,54	0,62
TNF- $\alpha$ <sub>ст</sub> , пг/мл	757,50 (101,00; 2319,00)	679,90 (142,00; 1430,00)	426,70 (106,00; 1130,00)	1540,00 (515,00; 2657,50)	322,00 (94,00; 772,00)	0,95	0,93	0,56
IL-1 <sub>сп</sub> , пг/мл	<b>2480,00 (707,50; 6917,50)*</b>	862,00 (251,00; 3747,00)	1677,50 (150,00; 9672,50)	360,00 (150,00; 2165,00)	344,50 (146,00; 1224,00)	0,29	0,57	0,16
IL-1 <sub>ст</sub> , пг/мл	550,00 (220,00; 12600,00)	3715,00 (1119,00; 7186,00)	4121,50 (2426,00; 9500,00)	4910,00 (3500,00; 5500,00)	1716,00 (436,00; 3598,00)	0,51	0,73	0,51
IFN- $\gamma$ <sub>сп</sub> , пг/мл	9,00 (0,00; 793,00)	<b>160,00 (107,50; 566,50)*</b>	42,00 (8,00; 346,00)	467,50 (68,50; 1749,50)	82,75 (23,00; 138,75)	0,22	0,54	0,29
IFN- $\gamma$ <sub>ст</sub> , пг/мл	110,00 (23,00; 1381,00)	1027,50 (678,50; 1385,50)	349,00 (135,00; 1580,00)	330,00 (193,00; 622,00)	598,00 (375,00; 3500,00)	0,20	0,31	0,51
IL-2 <sub>сп</sub> , пг/мл	16,80 (13,70; 22,50)	18,10 (4,10; 35,00)	23,25 (7,50; 29,05)	58,05 (16,10; 100,00)	9,30 (0,00; 14,10)	0,97	0,37	0,56
IL-2 <sub>ст</sub> , пг/мл	7,81 (3,50; 12,12)	25,10 (8,80; 78,90)	28,10 (4,40; 77,70)	160,00 (160,00; 160,00)	27,90 (0,00; 55,80)	0,31	0,28	1,00
IL-10 <sub>сп</sub> , пг/мл	165,00 (53,10; 168,50)	47,00 (8,30; 146,80)	26,60 (7,30; 40,20)	10,80 (0,00; 21,60)	20,40 (4,80; 54,90)	0,24	0,12	0,12
IL-10 <sub>ст</sub> , пг/мл	327,50 (1,10; 653,90)	115,40 (61,60; 193,95)	87,85 (12,70; 266,20)	1,90 (1,90; 1,90)	47,10 (14,20; 245,80)	1,00	0,63	1,00
IL-4 <sub>сп</sub> , пг/мл	10,40 (0,00; 15,30)	10,20 (3,30; 17,70)	7,60 (0,20; 18,90)	<b>6,70 (0,50; 6,80)*</b>	12,20 (9,90; 14,30)	0,66	0,96	0,65
IL-4 <sub>ст</sub> , пг/мл	10,50 (2,40; 29,15)	<b>13,60 (8,50; 25,50) **</b>	10,05 (3,60; 22,40)	<b>7,10 (5,50; 10,30)*</b>	13,30 (12,40; 16,00)	0,68	0,89	1,00

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05); \*\* – значимые различия в сравнении с уровнем показателя до начала лечения (p<0,05); сп – спонтанная секреция цитокина. ст – стимулированная секреция цитокина.

Таким образом, особенности средневывборочных характеристик таких параметров, как концентрация IgG и секреция IL-1, IL-4, TNF $\alpha$ , IL-10, выявленные нами в подгруппах больных до лечения, сохранились и после проведения НАХТ.

Таблица 27

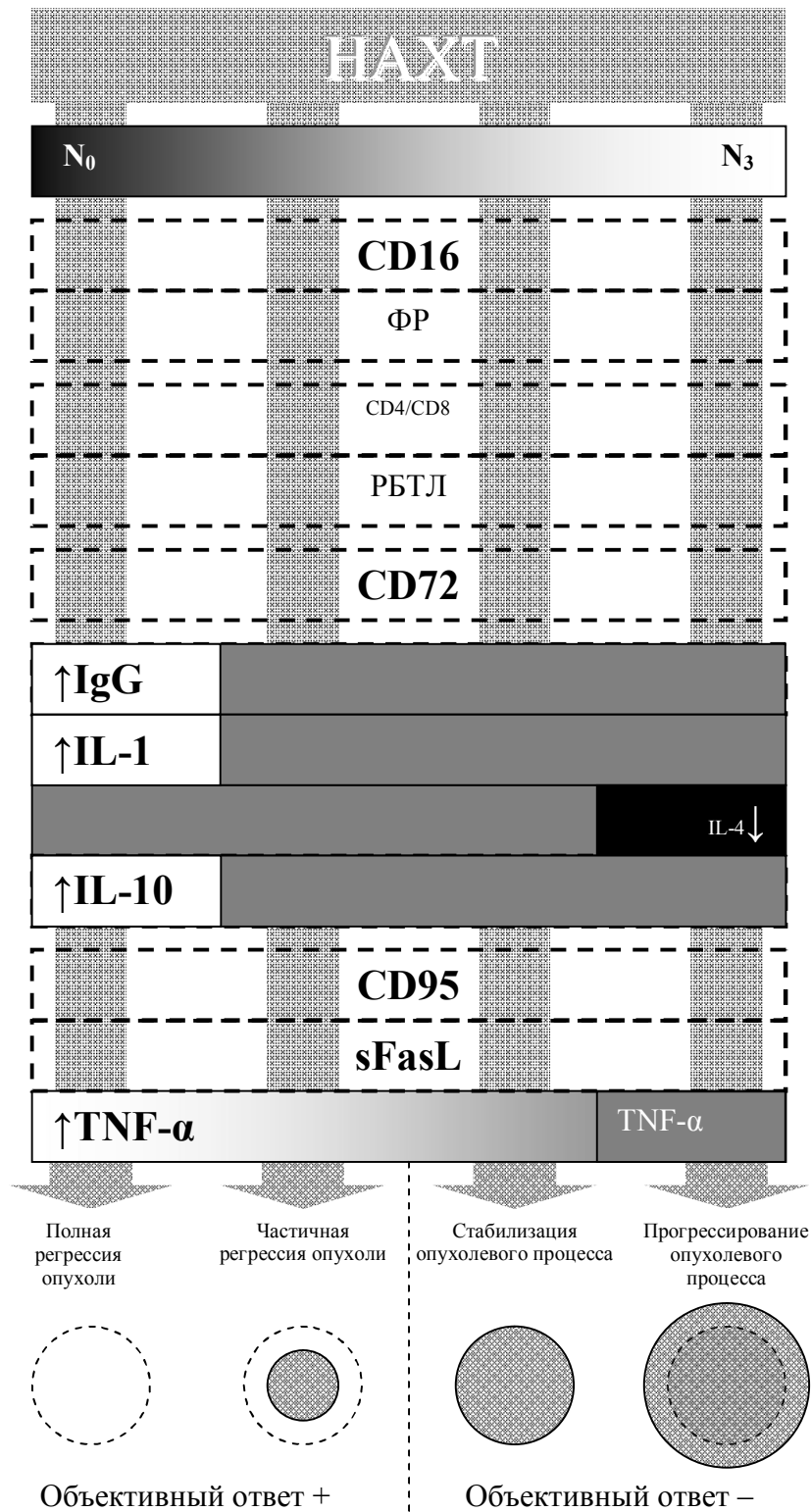
**Маркёры апоптоза у больных РМЖ после 2 курсов НАХТ и у здоровых доноров (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])**

Маркёры апоптоза	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)	Уровень значимости различий (p)		
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)		1-2	1-3	1-4
	1	2	3	4				
Относительное содержание МНПК с признаками апоптоза в ПК, %	<b>18,00</b> (14,00; 25,00)*	<b>36,00</b> (23,00; 45,00)*	<b>36,00</b> (23,00; 43,00)*	<b>34,00</b> (22,50; 40,50)*	12,00 (8,00; 16,00)	0,16	0,23	0,34
sFas, нг/мл	Нет данных	37,70 (37,50; 50,10)	<b>41,55</b> ( <b>32,95</b> ; <b>59,45</b> )**	46,60 (28,70; 64,50)	36,20 (30,25; 40,95)	1,00	1,00	1,00
sFasL, нг/мл	Нет данных	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	1,00	1,00	1,00

Примечание: \* – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (p<0,05); \*\* – значимые различия в сравнении с уровнем показателя до начала лечения (p<0,05); sFas – растворимый Fas-рецептор; sFasL – растворимый Fas-лиганд.

Интегральный результат оценки уровней иммунологических параметров после проведения НАХТ у пациентов с различной ее эффективностью представлен на рис. 13.

Тот факт, что интенсивность секреции ряда цитокинов оказалась устойчивой к цитостатическому воздействию химиотерапии, позволил сделать предположение о генетической обусловленности особенностей этого процесса у больных с различной эффективностью НАХТ.



**Рис. 13. Особенности средневыворочных характеристик иммунного статуса (после НАХТ) у пациентов с различной эффективностью НАХТ**

Примечания:

↑ или ↓ – показатель повышен или снижен относительно уровня здоровых доноров и/или между группами больных (см. гл. 3);

ФР, ИРФР – фагоцитарный резерв, интенсивность реакции фагоцитарного резерва;

РБТЛ ФГА – ФГА-стимулированная реакция бласттрансформации лимфоцитов;

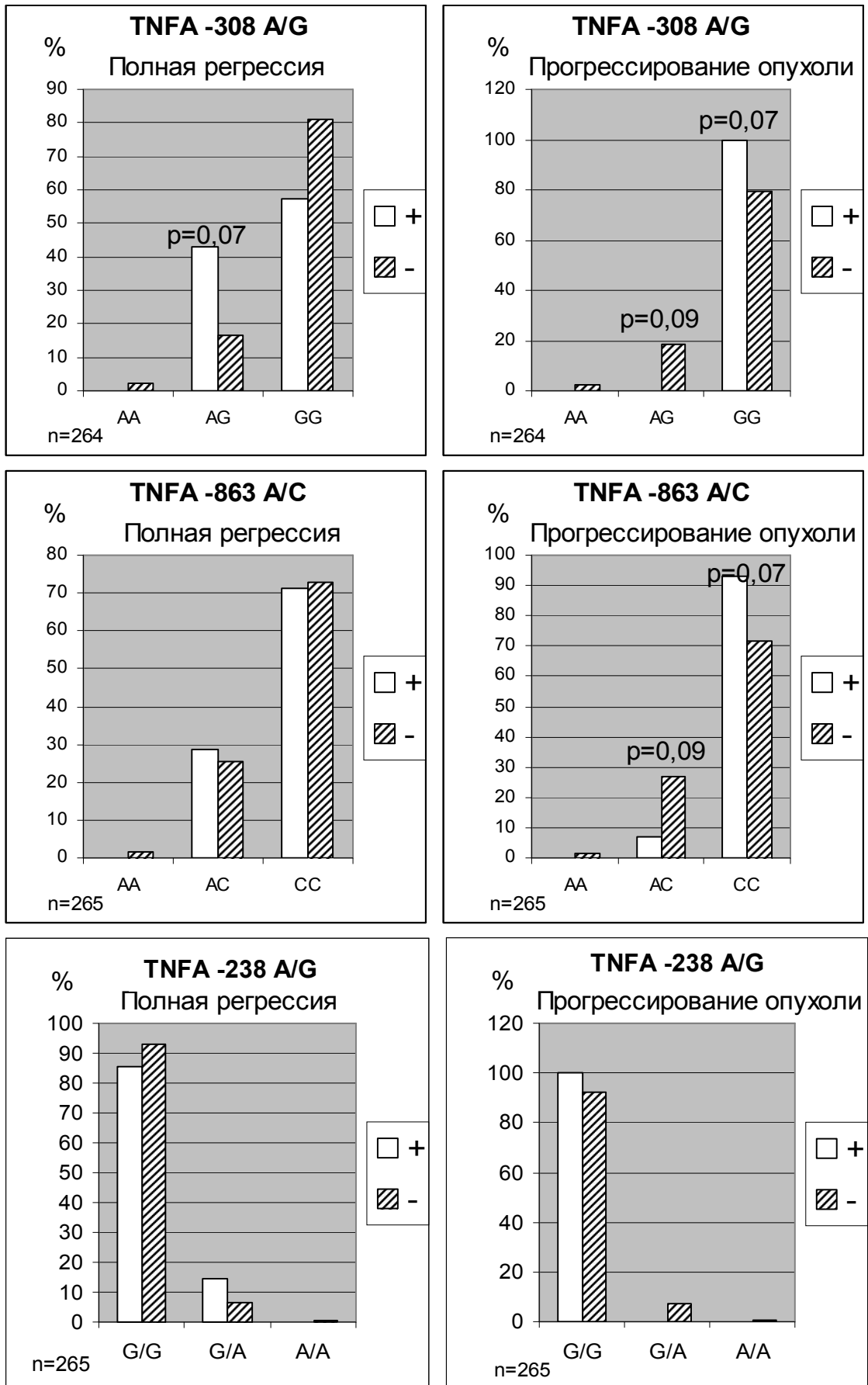
N<sub>0</sub>, N<sub>3</sub> – степень поражения регионарных лимфоузлов

### **3.9. Взаимосвязь полиморфных вариантов генов цитокинов, патогенетически значимых для опухолевого процесса, с эффективностью НАХТ**

Результаты иммуногенетических исследований выявили ассоциации между различными эффектами НАХТ и носительством определенных аллельных вариантов генов, контролирующих интенсивность синтеза цитокинов, изученных в настоящей работе (рис.14-17, где **p** - уровень значимости различий, \* - статистически значимые различия).

Согласно данным литературы [31, 37, 70, 78, 80, 82, 251, 296], аллель А полиморфизма -308A/G гена TNFA ассоциируется с более высоким уровнем секреции TNF- $\alpha$ , что согласуется с результатами настоящего исследования (рис. 14). У больных с прогрессированием опухоли на фоне НАХТ наблюдалась тенденция к повышению частоты генотипа G/G ( $p=0,07$ ), а у больных с полной регрессией – гетерозиготного варианта гена TNFA - 308A/G ( $p=0,07$ ) (рис. 14).

Оценить влияние полиморфизмов -238 A/G и -863 A/C на эффективность НАХТ TNF- $\alpha$  в нашем исследовании не представлялось возможным, поскольку, несмотря на выявленную ассоциацию ( $p=0,07$ ) между генотипом C/C полиморфизма -863 A/C с прогрессированием опухоли на фоне НАХТ, данные литературы о сопряженности данного генотипа с уровнем экспрессии гена TNFA были противоречивы [95, 245, 293, 296, 297]; связь между эффективностью НАХТ и наличием полиморфизма -238 A/G статистически не была выявлена (рис. 14).

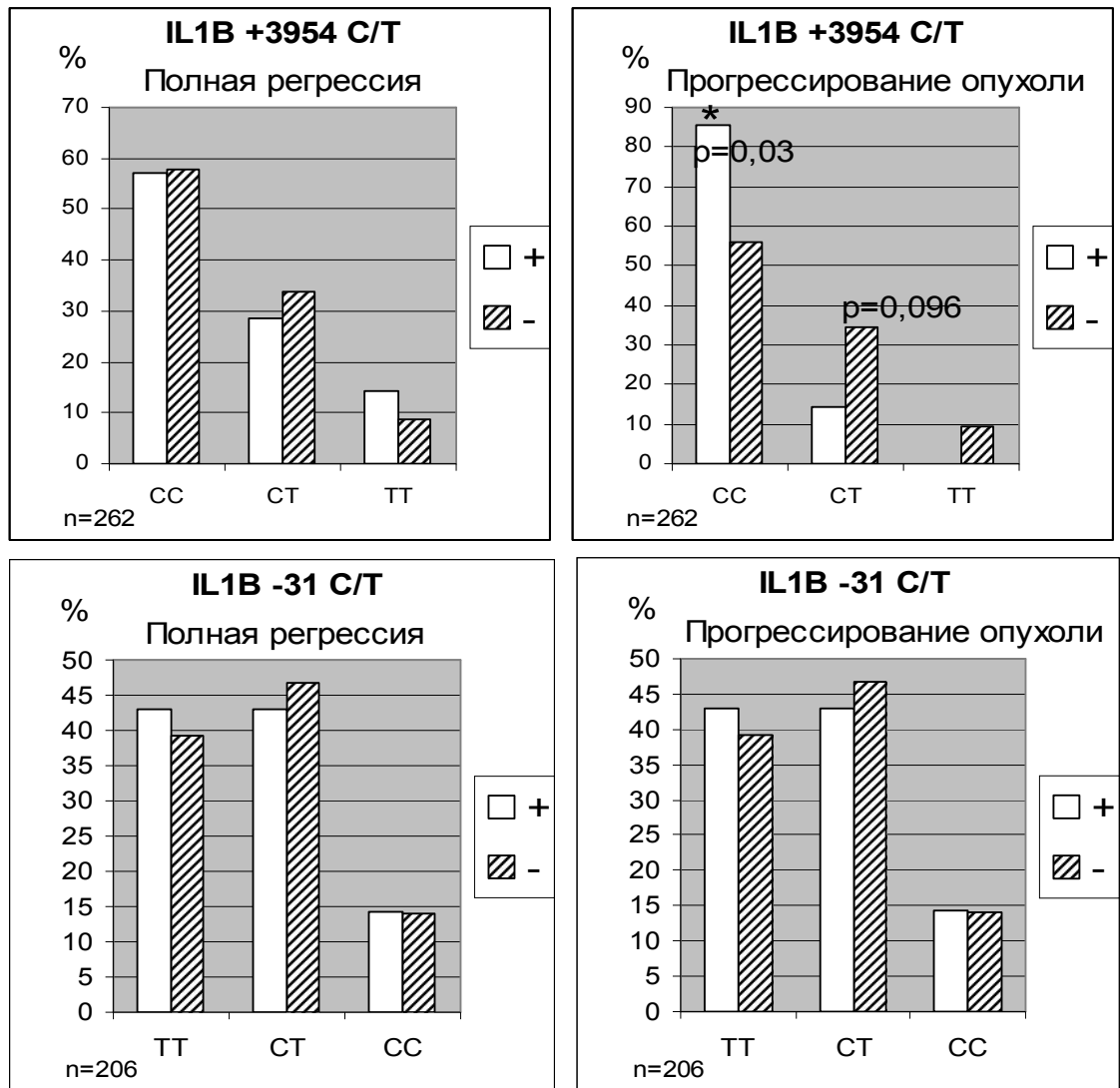


**Рис. 14. Ассоциация эффективности НАХТ с частотой выявления полиморфных вариантов гена TNFA**

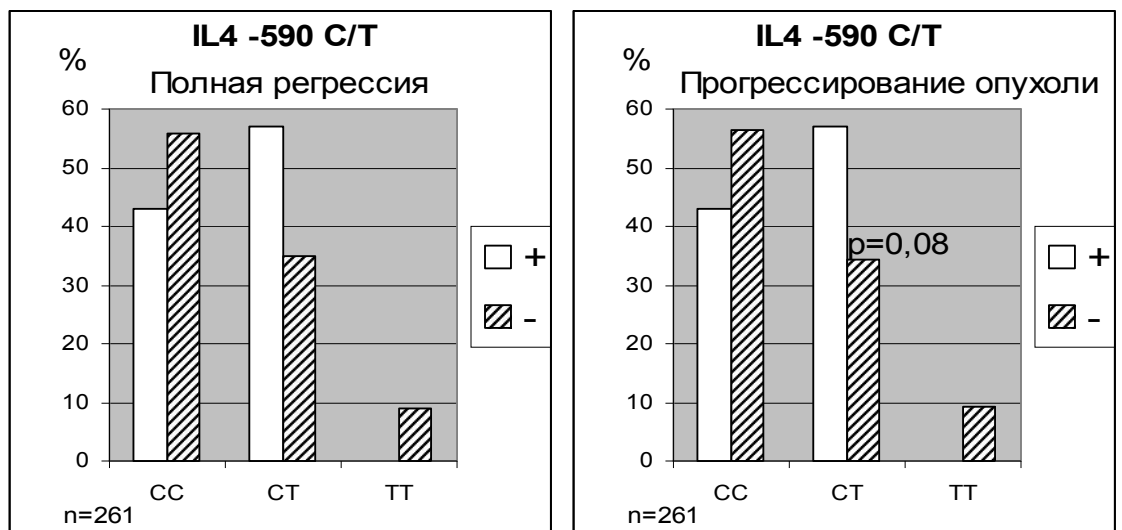
В доступной литературе было найдено значительное количество публикаций, посвящённых исследованиям генетических полиморфизмов генов, отвечающих за синтез и функционирование IL-1 $\beta$ , а также связи индивидуальных генетических особенностей с патогенезом онкологических заболеваний. По данным Lee K.M. et al. (2006) и Liu J et al. (2006), аллельный полиморфизм по гену IL-1 был связан с предрасположенностью к развитию РМЖ [179, 182], а по данным Grimm C. et al. (2009) носительство мутантных аллелей, кодирующих рецептор IL1RN было независимо связано с сокращением безрецидивного периода и общей выживаемости больных РМЖ [289]. Кроме того, предполагается, что повышенные уровни IL-1 $\beta$  впоследствии способствуют провоспалительному микроокружению и опухолевой прогрессии. Доказано, что ряд генных полиморфизмов IL1B приводят к изменению экспрессии белка IL-1 $\beta$  [32, 100, 193, 269]. Данные Исмагуловой М.М. с соавт. (2005) о сопряжённости аллеля Т полиморфизма +3954С/Т с более высокой продукцией IL-1 $\beta$  [32] косвенно подтвердились в настоящем исследовании. Мы выявили, что 86% больных, для которых отмечено прогрессирование опухоли после НАХТ, несут СС генотип гена IL1B (IL1B +3954 С/Т полиморфизм), ассоциированный с низкой экспрессией цитокина, в то время, как ТТ-генотип, обеспечивающий высокий уровень экспрессии гена IL1B [32, 246], среди пациентов этой группы не встречался (рис. 15). В то же время более 42% пациентов с полной регрессией являются носителями Т-аллеля, при этом полная регрессия опухоли ассоциировалась с высокой секрецией IL-1 $\beta$  клетками крови (рис. 15). Связь между носительством полиморфных вариантов гена IL1B -31 С/Т и эффективностью НАХТ отсутствовала (рис. 15).

Анализ частоты встречаемости генетического полиморфизма -590 С/Т гена IL-4 показал ассоциацию ( $p=0,08$ ) прогрессирования опухолевого процесса на фоне НАХТ с его гетерозиготным состоянием (С/Т) (рис. 16).



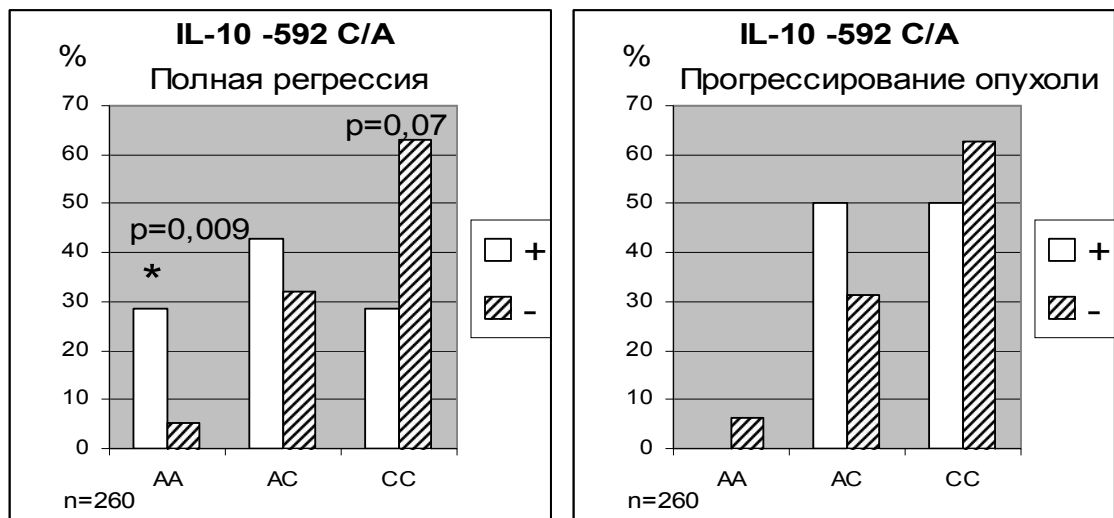


**Рис. 15. Ассоциация эффективности НАХТ с частотой выявления полиморфных вариантов гена IL1B**



**Рис. 16. Ассоциация эффективности НАХТ с частотой выявления полиморфных вариантов гена IL4**

Полная регрессия опухоли, при которой наблюдалась высокая секреция IL-10 клетками крови пациентов, ассоциировалась с генотипом -592AA гена IL10, который встречался почти у 30% больных с полной регрессией и только у 5% больных с менее результативным лечением (рис. 17). Большинство авторов [31, 67, 78, 82, 210, 214] с более высокой продукцией ассоциировали наличие А-аллеля полиморфизма -592 С/А гена IL10, что согласуется с данными настоящего исследования, как в отношении распределения частоты генотипов, так и в отношении уровня секреции IL-10 у больных с разной эффективностью НАХТ. Полученные рядом зарубежных авторов данные о сопряжённости 592А-аллеля с низкой продукцией цитокина [198, 217, 276] можно объяснить популяционными особенностями изученных выборок и, возможно, более весомой ролью других полиморфизмов гена IL10 или межгенных взаимодействий во влиянии на уровень продукции цитокина.



**Рис. 17. Ассоциация эффективности НАХТ с частотой выявления полиморфных вариантов гена IL10**

Итак, при анализе взаимосвязи полиморфных вариантов генов цитокинов с эффективностью НАХТ мы выявили, что у больных с прогрессированием опухоли достоверно чаще встречалась гомозиготность по (+3954)С-аллелю гена IL1В, с которым связана низкая продукция цитокина, а полная регрессия опухоли ассоциировалась с генотипом -592AA гена IL10, который, по данным большинства авторов, связан с высокой продукцией IL-10.

## Заключение

Исходя из главного механизма химиотерапии, трудно представить, что реализация полной регрессии опухоли может быть осуществлена исключительно за счёт прямого цитостатического воздействия химиопрепарата на клетку. Химиопрепараты воздействуют преимущественно на активно пролиферирующие клетки. Так как действие их ограничено во времени, а в опухоли всегда присутствуют покоящиеся клетки, то существует определённая вероятность того, что часть клеток опухолевого клона сохранится после химиотерапии. Следовательно, для достижения полной регрессии опухоли должны реализоваться дополнительные механизмы, вызывающие гибель опухолевых клеток. Причём, механизмы эти должны быть индуцированы химиотерапевтическими препаратами. Если бы они были достаточно активированы до химиотерапевтического воздействия – опухоль бы регрессировала без терапевтического вмешательства. После же химиотерапевтического воздействия резервы противоопухолевых механизмов защиты должны сохраняться на уровне, достаточном для уничтожения опухолевых клеток, не погибших от прямого цитостатического влияния. Таким образом, регрессия опухоли при воздействии НАХТ происходит в результате прямого цитостатического действия химиопрепаратов и дополнительных факторов, в том числе, согласно результатам нашего исследования и данных литературы, относящихся к иммунной системе.

В настоящей работе были изучены особенности функционирования иммунной системы, сопряжённые с различной эффективностью неоадьювантной химиотерапии у больных РМЖ, на основе комплексного анализа клиничко-anamнестических и лабораторных данных.

Показано, что в значительной степени результат НАХТ определяется состоянием регионарных лимфоузлов: распространение злокачественного процесса в регионарные лимфоузлы ассоциировано с отсутствием объективного ответа на НАХТ. Принято считать, что одним из наиболее

значимых прогностических факторов неблагоприятного исхода заболевания является наличие метастазов опухоли в регионарных лимфатических узлах [59]. Принимая во внимание важную роль лимфоузлов в ограничении опухолевой экспансии, можно полагать, что метастатическое их поражение, сопряженное с потерей функции локального иммунного надзора, отражается на состоянии иммунной системы в целом.

Результаты исследования параметров иммунного статуса показали, что метастатическое поражение лимфоузлов не является единственным фактором, влияющим на результат неoadъювантной химиотерапии. Полная регрессия опухоли после НАХТ у больных РМЖ без регионарных метастазов выявляется гораздо чаще, чем у больных с наличием таковых, однако при детальном анализе индивидуальных данных было выявлено несколько больных без метастазов с более худшими результатами, вплоть до прогрессирования (5 человек), а также 1 больная с наличием единичных регионарных метастазов ( $N_1$ ) и полной регрессией первичной опухоли. Более высокая эффективность химиотерапии у больных с сохранными лимфоузлами может косвенно свидетельствовать о важной роли иммунологических механизмов в реализации эффективности НАХТ, так как степень морфологической сохранности или повреждения лимфоузлов косвенно отражает сохранность их функции. Функцией же лимфоузлов является обеспечение локального иммунитета, и, в частности, регионарных лимфоузлов – локальных иммунных реакций в зоне роста опухоли.

Как уже говорилось ранее, в противоопухолевом иммунном ответе могут быть задействованы реакции адаптивного и врождённого иммунитета. Причём, если адаптивный иммунитет играет основную роль на начальных этапах развития опухоли при достаточной иммуногенности опухолевых клеток, то противоопухолевые реакции с участием механизмов врождённого иммунитета выходят на первый план по мере распространения опухолевого процесса [42]. Реализовать специфический противоопухолевый ответ невозможно без механизмов адаптивной иммунной системы, причём

основными эффекторами противоопухолевого иммунитета считаются Т-цитотоксические лимфоциты, хотя, как правило, при развитии специфического противоопухолевого иммунного ответа синтезируются также IgG-антитела к широкому спектру опухолюсоциированных антигенов [157].

Мы выявили, что иммунологические параметры, оцененные до начала противоопухолевого лечения, могут быть использованы в качестве предикторов эффективности химиотерапии.

До проведения цитостатической предоперационной терапии у больных с последующей полной регрессией опухоли имелись косвенные признаки большей готовности, чем у пациенток других групп, к реализации противоопухолевого ответа (смещение соотношения CD4/CD8 в сторону Т-цитотоксических лимфоцитов, сохраняющая способность к митоген-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов), а также стимуляции фагоцитоза и синтеза провоспалительных цитокинов при сохранении способности к синтезу IL-10. После неoadьювантной терапии в этой же группе пациентов были зарегистрированы признаки лимфоидного истощения, затрагивающего субпопуляции клеток, обладающих противоопухолевой эффекторной активностью (значимое снижение абсолютного числа лимфоцитов, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-клеток, абсолютного числа CD25<sup>+</sup>-клеток). У пациентов с полной регрессией снижение уровня данных клеточных субпопуляций могло быть связано с их активированным состоянием до начала неoadьювантной химиотерапии, что подтверждается данными об активации рецепторных механизмов апоптоза. Возможно, определённый вклад в реализацию противоопухолевых эффектов внесла элиминация Treg, относящихся к субпопуляции CD25<sup>+</sup>-клеток.

Используя теоретические данные, и, опираясь на выявленные нами иммунологические предикторы эффективности НАХТ и закономерности их изменения в процессе этого этапа лечения, можно предположить, какие из

иммунных механизмов могли быть задействованы в реализации эффектов НАХТ.

Исходя из того, что основными эффектами противоопухолевых препаратов является инициация апоптоза или остановка деления как патологически изменённой, так и нормальной клетки, на основании выявленных в настоящем исследовании иммуно-морфологических параметров у пациенток с различной эффективностью НАХТ и данных литературы, можно предположить возможные механизмы участия иммунной системы в реализации эффективности НАХТ. Компоненты иммунной системы могут как напрямую вызывать апоптоз опухолевых клеток, так и реализовывать антигензависимые и антигеннезависимые реакции в отношении клеток опухоли (рис. 18).

В настоящем исследовании с высокой эффективностью НАХТ были сопряжены: провоспалительная настроенность иммунной системы, функционально сохраненные антигензависимые механизмы иммунитета, активация механизмов апоптоза по внешнему (через рецепторы семейства фактора некроза опухоли) пути, повышенная способность лимфоцитов к секреции противовоспалительного цитокина IL-10 (возможно, по механизму отрицательной обратной связи).

Об усилении иммуногенности опухоли у больных с наличием объективного ответа опухоли на НАХТ мы можем говорить только теоретически, так как в настоящем исследовании не оценивались специфические противоопухолевые реакции. Однако признаки активного функционирования звеньев иммунитета, потенциально способных участвовать в специфических противоопухолевых иммунных реакциях у данной категории больных, свидетельствуют о возможности реализации данного механизма в модуляции иммунного ответа против опухоли у больных РМЖ после НАХТ.

Неэффективная НАХТ в данном исследовании ассоциировалась с повышенным уровнем таких показателей неспецифического иммунитета, как

абсолютное и относительное количество натуральных киллеров и показателей кислородзависимой биоцидности нейтрофилов (фагоцитарного резерва) при снижении пролиферативной активности Т-звена. Кроме этого следует отметить, что иммунограммы больных РМЖ, в отличие от здоровых, характеризовались более высоким относительным количеством В-клеток. Причем, у пациенток с низкой эффективностью НАХТ этот показатель был выше, чем у больных с благоприятным результатом НАХТ. Выявленная закономерность может быть объяснена функциональным напряжением Th2-пути иммунного ответа по мере развития опухолевого процесса на фоне ослабления функции Th1.

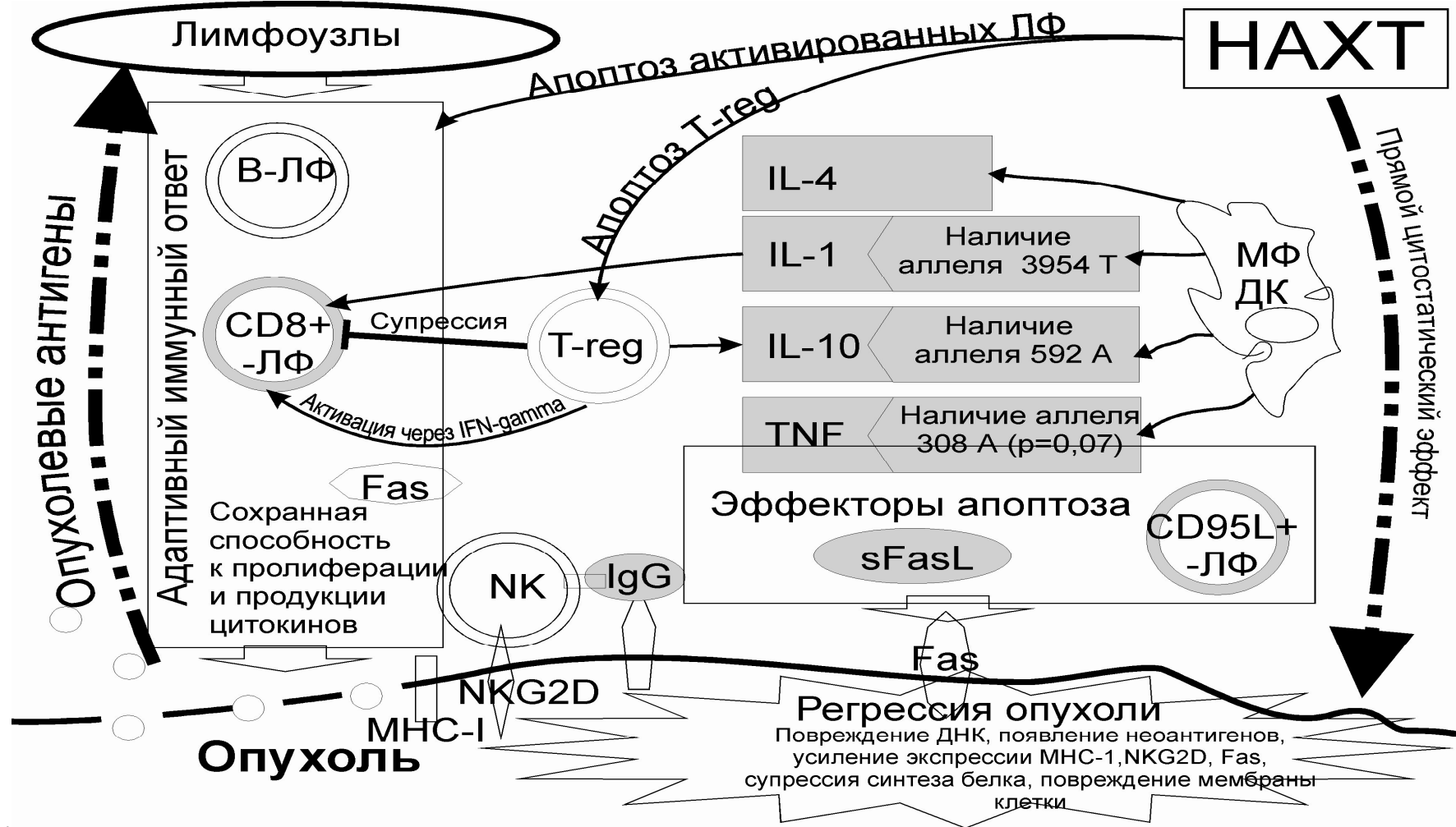
Полученные нами результаты не противоречат тезису о том, что эффекторная роль врождённых, антигеннезависимых противоопухолевых иммунных механизмов возрастает по мере прогрессирования опухолевого процесса и утраты фенотипических маркеров опухолевых клеток (белки МНС, опухолеспецифичные и опухолеасоциированные антигены). Данный тезис в нашем исследовании также подтверждается выявленной зависимостью между высокой степенью метастатического поражения регионарных лимфоузлов и неэффективностью НАХТ.

Вклад генетических факторов в реализацию эффектов НАХТ имеет особое значение. Представляется, что в условиях агрессивного иммуносупрессивного воздействия цитостатических препаратов генетические механизмы, как наиболее устойчивые, могут играть значительную роль в поддержании определенного уровня противоопухолевых агентов, например, цитокинов. В пользу этого тезиса говорит тот факт, что соотношение стандартизированных на количество клеток уровней секреции ряда цитокинов в группах с разной эффективностью НАХТ после воздействия химиопрепаратов изменялось незначительно. При этом количественный и качественный состав разных субпопуляций циркулирующих в крови иммуноцитов в тех же группах претерпевал значительные изменения. Ценность генетических маркёров

обусловлена также тем, что по наличию того или иного генотипа мы можем с определённым допущением судить об уровне продукции цитокина внутри опухоли и проецировать иммунные процессы, происходящие на периферии, на локальный уровень, что является шагом к персонализации назначения НАХТ.

Таким образом, опираясь на данные литературы и результаты настоящего исследования, можно заключить, что у больных РМЖ имеются характерные особенности функционирования иммунной системы, сопряжённые с различной эффективностью НАХТ. Результаты проведенного исследования позволяют нам рекомендовать оценку клинико-лабораторных иммунологических параметров для прогнозирования исхода неoadьювантной цитостатической терапии. Выявленные нами особенности функционирования иммунной системы у пациенток с наличием клинических признаков иммунопатологии и разной степенью поражения регионарных лимфоузлов позволяют понять возможные иммунологически-опосредованные механизмы реализации противоопухолевых эффектов на клеточном и молекулярном уровне. В дальнейшем результаты настоящего исследования могут служить основой для разработки патогенетически обоснованных иммунотерапевтических подходов в комплексной терапии рака молочной железы и других злокачественных опухолей.





**Рис. 18.** Роль иммунной системы в реализации противоопухолевого эффекта НАХТ (по данным Zitvogel L., 2008, Fridman W.H. et al., 2011 и по результатам собственных исследований): серым цветом выделены результаты настоящего исследования; ДК – дендритная клетка; ЛФ – лимфоцит; МФ – макрофаг; МНС-I – главный комплекс гистосовместимости-I

## ВЫВОДЫ

1. Высокий до начала лечения уровень спонтанной секреции провоспалительных цитокинов мононуклеарами крови (TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ ), повышение количества Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8+), активация В-звена иммунитета (высокая концентрация IgG), высокое содержание Fas-лиганд-экспрессирующих лимфоцитов и Fas-лиганда в сыворотке, высокий уровень спонтанной и стимулированной секреции IL-10 мононуклеарами крови, сохранение пролиферативного потенциала Т-лимфоцитов и функциональных резервов нейтрофильных лейкоцитов сопровождаются усилением клинической эффективности неoadъювантной химиотерапии у больных раком молочной железы.
2. Высокая готовность мононуклеаров крови к реализации механизмов рецепторного апоптоза с участием молекул, относящихся к семейству фактора некроза опухолей (TNF- $\alpha$ , FasL, sFasL), у больных раком молочной железы до лечения связана с регрессией опухоли на фоне неoadъювантной химиотерапии.
3. Высокие значения абсолютного и относительного количества циркулирующих в крови натуральных киллеров, снижение функционального резерва Т-лимфоцитов, повышение функциональной активности нейтрофильных фагоцитов, низкая способность к спонтанной секреции IL-4 и спонтанной и стимулированной секреции IL-10 мононуклеарами крови у больных раком молочной железы до начала лечения сопровождаются отсутствием клинической эффективности неoadъювантной химиотерапии.
4. У больных раком молочной железы с полной регрессией опухоли клинические проявления иммунодефицита в форме инфекционного синдрома выявляются реже, чем в других клинических группах. Ослабление функциональной активности Т-клеток, увеличение количества циркулирующих NK-клеток, CD95<sup>+</sup>- и CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов сопровождают высокую степень метастатического поражения регионарных лимфоузлов

при раке молочной железы, ассоциированную с низкой эффективностью неoadьювантной химиотерапии.

5. Неoadьювантная химиотерапия вызывает повышение спонтанной секреции IFN- $\gamma$  мононуклеарами крови у больных раком молочной железы с объективным ответом на цитостатическую терапию и способствует повышению концентрации растворимой формы Fas-рецептора у больных раком молочной железы с отсутствием объективного ответа. Особенности исходных (до лечения) уровней секреции цитокинов (IL-1, IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$ ) мононуклеарами крови, ассоциированные с эффективностью неoadьювантной химиотерапии, сохраняются и после цитостатического лечения.
6. Полная регрессия опухоли после проведения неoadьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы ассоциирована с функционально высокоактивным генотипом IL10 -592AA; с прогрессированием опухолевого процесса связан функционально низкоактивный генотип IL1B +3954CC.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Больным раком молочной железы рекомендовано комплексное клиничко-лабораторное иммунологическое обследование перед проведением неoadьювантной химиотерапии с целью оценки прогноза её эффективности.

Отсутствие анамнестически выявляемых признаков иммунологической недостаточности, высокая пролиферативная способность Т-лимфоцитов, сохранность функциональных резервов фагоцитов, высокая спонтанная секреция IL-10 позволяют до начала противоопухолевой терапии прогнозировать объективный ответ на неoadьювантную химиотерапию у больных раком молочной железы.

**БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает глубокую признательность и благодарность д-ру мед. наук М.Н. Стахеевой, д-ру мед. наук, профессору Е.М. Слонимской, д-ру мед. наук, профессору В.М. Перельмутеру, д-ру мед. наук, профессору И.Г. Фроловой, д-ру мед. наук Н.А. Черевко, канд. мед. наук Е.Ю. Гарбукову, канд. биол. наук Н.В. Литвякову, канд. мед. наук Н.Н. Бабышкиной, канд. мед. наук П.А. Гервас, канд. биол. наук Е.А. Малиновской, канд. мед. наук Л.В. Гердт, канд. мед. наук О.А. Ананиной, канд. биол. наук М.А. Булдакову, канд. биол. наук Е.В. Денисову, Ю.Л. Кокориной, канд. мед. наук А.В. Дорошенко, Н.А. Тарабановской, сотрудникам клинической группы лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии М.Г. Клебан и О.Г. Ермоленко за помощь, оказанную при проведении исследований и обсуждении результатов.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абелев, Г.И. Дифференцировочные антигены в опухолях – зависимость от механизмов канцерогенеза и прогрессии / Г.И. Абелев // Мол. биол. – 2003. – Т. 37, №1. – С. 4-11.
2. Абелев, Г.И. Иммунология опухолей человека / В.И. Абелев // Канцерогенез / под ред. Д.Г. Заридзе. – М.: Научный мир, 2000. – С. 333-341.
3. Абелев, Г.И. Механизмы дифференцировки и опухолевый рост / Г.И. Абелев // Биохимия. – 2000. – Т. 65, вып. 1. – С. 127-138.
4. Акимов, М. А. Модификаторы биологических реакций в лечении диссеминированной меланомы / М. А. Акимов, М. Л. Гершанович // Вопросы онкологии. – 2002. – Т. 48, №2. – С. 172-178.
5. Акмаев, И.Г. От нейроэндокринологии к нейроиммуноэндокринологии / И.Г. Акмаев, В.В. Гриневич // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т. 131, №1. – С. 22-33.
6. Алимходжаева, Л.Т. Иммуноморфологические изменения в опухолях молочной железы при неoadъювантной химиотерапии в условиях искусственной гипогликемии / Л. Т. Алимходжаева // Опухоли женской репродуктивной системы. 2008. - № 2. – С. 35-37.
7. Антонов, В. Г. Патогенез онкологических заболеваний. Цитоплазматические и молекулярно-генетические механизмы иммунной резистентности малигнизированных клеток / В. Г. Антонов, В. К. Козлов // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 23-33.
8. Антонов, В. Г. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы. Внеклеточные и клеточные механизмы общей иммунодепрессии и иммунной резистентности / В. Г. Антонов, В. К. Козлов // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 8-19.

9. Артамонова, Е. В. Место иммуномодуляторов в терапии рака молочной железы / Е. В. Артамонова // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2007. - №1-2. – С. 23-26.
10. Барышников, А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин. – М.: Едиториал УРСС, 2002. – 320 с.
11. Белецкий, И.П. Пути передачи цитотоксического сигнала рецепторами семейства TNF-Rs / И.П. Белецкий, А.Б. Мошникова, О.В. Русакова // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 4. – С. 377-395.
12. Бережная, Н.М. Система интерлейкинов и рак (новые аспекты взаимодействия опухоли и организма) / Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун. – Киев: ДИА, 2000. – 224 с.
13. Боровиков, В.П. Statistica. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. – М.: Информационно-издательский дом "Филинь", 1997.- 608с.
14. Бредер, В.В. Анемия при злокачественных опухолях / В.В. Бредер, В.А. Горбунова, Н.С. Бесова // Современная онкология. – 2003. – Т. 4, №3. – С. 134-136.
15. Бутенас, С. Свертывание крови / С. Бутенас, К.Г. Манн // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 1. – С. 107-115.
16. Василенко, А.М. Цитокины в сочетанной регуляции боли и иммунитета / А.М. Василенко, Л.А. Захарова // Усп. совр.биол. – 2000. – Т. 120, №2. – С. 174-189.
17. Вебер, Дж. Упорядоченная биохимическая программа экспрессии гена в раковых клетках / Дж. Вебер // Биохимия. – 2001. – Т. 66, вып. 8. – С. 1438-1449.
18. Ветлугина, Т. П. Клиническая иммунология в психиатрии и наркологии / Т. П. Ветлугина, С. А. Иванова, Т. И. Невидимова. – Томск: МГП «РАСКО», 2001. – 92 с.

19. Ветлугина, Т.П. Методика определения иммунных комплексов в сыворотке крови больных шизофренией / Т.П. Ветлугина. – Методические рекомендации. – Томск, 1986. – 10 с.
20. Вирусные и опухолевые антигены, их использование в конструировании противораковых вакцин / О.И. Киселёв, П.Г. Бендзко, Л.Л. Школьникова и др. // Мед. акад. журн. – 2002. – Т. 2, №1. – С. 19-33.
21. Влияние длительного введения синтетического дипептида на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов в эксперименте и *in vivo* / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, А.С. Симбирцев, Л.В. Ломатидзе // Иммунология. – 1999. - №6. – С. 40-43.
22. Влияние ладастана на пролиферативную активность и апоптоз Т-лимфоцитов периферической крови / Ю. В. Вахитова, С. В. Сибиряк, Н. Н. Курчатова, С. Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65, № 6. – С. 49-52.
23. Воронцова, А.Л. Интерферон как важный элемент оптимизации лечения онкологических больных / А.Л. Воронцова, Ю.И. Кудрявец // Онкология. – 2000. - №1-2. – С. 16-20.
24. Ганцев, Ш. Х. Онкология: Учебник / Ш. Х. Ганцев – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 516 с.: ил.
25. Гинкул, Л. Б. Белки, принимающие участие в Fas-опосредованном апоптозе между опухолевыми клетками и лимфоцитами при их сокультивировании *in vitro* / Л. Б. Гинкул, С. А. Александрова, И. М. Швембергер // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53, № 2. – С. 185-193.
26. Давыдов М.И. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2007 г. / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель // Вестник Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина РАМН: ежеквартальный научно-практический журнал. – 2009. – Т. 20, Прил. 1 к №3. – С.52-90.

27. Давыдов, М.И. Практическая маммология / М.И. Давыдов, В.П. Летягин.- М.: Практическая медицина, 2007. – 272 с.
28. Заславская, М. И. Уровень растворимых молекул гистосовместимости I класса при взаимодействии нейтрофилов крови человека с дрожжевой и гифальной формами *Candida albicans* / М.И. Заславская, М.А. Крыжанова, В.В. Новиков // Материалы 4-го Всероссийского конгресса по медицинской микологии. – М., 2006. – Т. 7. – С. 47-48.
29. Зинченко, М.В. Применение ликопида и виферона в процессе лучевого лечения больших аденокарциномой эндометрия / М.В. Зинченко // Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52, № 2. – С. 183-186.
30. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена», 2012. 260 с.
31. Зонова, Е.В. Оценка эффективности клинико-иммунологических и иммуногенетических критериев прогноза клинического полиморфизма и терапии ревматоидного артрита: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Е.В. Зонова. – М.-2010. – 55 с.
32. Имангулова, М. М. Полиморфизм кластера гена интерлейкина 1 у больных туберкулёзом лёгких /М. М. Имангулова, А. Р. Бикмаева, Э. К. Хуснутдинова // Цитокины и воспаление. – 2005. – № 1. – С. 36-41.
33. Иммунологические и клинические аспекты применения ксеновакцинотерапии в лечении меланомы / В. И. Селедцов, М. А. Фельде, Д. М. Самарин и др. // Российский онкологический журнал. – 2006. - № 4. – С.23-28.
34. Кадагидзе, З. Г. Новые подходы к регуляции противоопухолевого иммунитета / З. Г. Кадагидзе // Маммология. – 2007. - № 1. – С. 10-12.
35. Кадагидзе, З. Г. Современные подходы к иммунотерапии опухолей / З. Г. Кадагидзе // Новости прикладной иммунологии и аллергологии. – 2001. - № 5. – С. 12-13.



36. Карпов, И. А. Использование цитокинотерапии в реконструктивно-восстановительной хирургии головы и шеи / И. А. Карпов, И. И. Долгушин, А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 22-26.
37. Карпова, А.В. Сочетанный анализ аллельного полиморфизма генов цитокинов TNFA, IL4, IL5 и HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 при различных вариантах клинического течения атопического дерматита: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.В. Карпова. – Новосибирск, 2009. – 22 с.
38. Катцунг, Б.Г. Базисная клиническая фармакология: Пер. с англ. / Б.Г. Катцунг. – М.; СПб.: Бином; Невский диалект, - 1998. – Т. 2. – С. 89-225.
39. Кетлинский, С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев – СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2008. – 552 с.
40. Кетлинский, С.А. Эндогенные иммуномодуляторы / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев, А.А. Воробьёв. – СПб.: Гиппократ, 1992. – 256 с.
41. Климов, В.В. Иммунная система и основные формы иммунопатологий / В.В. Климов. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2006. – 224 с.
42. Клиническая иммунология и аллергология: Учебно-методическое пособие / Под редакцией В.В. Климова, Томск, 2006 г., 180 с.
43. Козлов, В.К. Иммунотерапия рекомбинантными цитокинами в лечении онкологических больных / В.К. Козлов, О.Е. Молчанов, Г.М. Жаринов // Успехи клинической иммунологии и аллергологии / под. ред. А.В. Караулова. – М.: Региональное отделение РАЕН, 2002. – С. 263-279.
44. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – 352.
45. Летягин В.П. X Международная конференция в Сан-Галлене: лечение раннего рака молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2007. - №1-2. С. 37.

46. Лукина, Е.А. Система моноклеарных фагоцитов и биологические эффекты провоспалительных цитокинов / Е.А. Лукина // Рос. журн. гастр., колопрот. – 1998. - №5. – С. 7-13.
47. Методы постановки реакции бласттрансформации в микромодификации / В.В. Хоробрых, А.В. Пронин, А.Ф. Киркин, А.В. Санин // Иммунология. – 1983. - № 3. – С. 76-79.
48. Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) / Редакторы русского перевода: проф. С. А. Тюлядин, канд. мед наук Д. А. Носов; проф. Н. И. Переводчикова. — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010. — 436 с.
49. Моисеенко, В. М. Возможности активной специфической иммунотерапии на основе аллогенных вакцин для лечения злокачественных новообразований / В. М. Моисеенко, А.Б. Данилова, Н. В. Тюкавина // Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52, № 3. – С. 258-266.
50. Моисеенко, В.М. Вакцинация злокачественных опухолей / В.М. Моисеенко, и.А. Балдуева, К.П. Хансон. // Вопр. онкол. – 1999. – Т. 45. – С. 327-333.
51. Моисеенко, В.М. Возможности вакцинотерапии меланомы кожи / В.М. Моисеенко // Практ. онкол. – 2001. – Т. 4, №8. – С. 58-64.
52. Молчанов, О. Е. Современные тенденции применения препаратов рекомбинантного интерлейкина 2 в онкологии / О. Е. Молчанов, М. И. Карелин, Г. М. Жаринов // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 38-47.
53. Москалёва, Е. Ю. Перспективы создания противоопухолевых вакцин с использованием дендритных клеток человека / Е. Ю. Москалёва, С. Е. Северин // Иммунология. – 2002. - № 1. – С. 8-15.
54. Неoadьювантное лечение рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, А.Е. Клецель и др. // Вместе против рака. Сайт Союза

- противораковых организаций России [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://netoncology.ru/press/articles/561/1966/>
55. Олейник, Е. К. Система апоптоза Fas-FasL в онкогенезе / Е. К. Олейник, М. Ю. Донников, В. М. Олейник // Иммунология. – 2004. - № 4. – С. 251-255.
  56. Орлова, Р. В. Анализ влияния программной полихимиотерапии на клиническое состояние, биохимические и иммунологические показатели гомеостаза у больных раком молочной железы / Р. В. Орлова, Л. Ф. Чернецова, О. Н. Матвеева // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53, № 4. – С. 411-418.
  57. Петри, А. Наглядная статистика в медицине. / А. Петри, К. Сэбин. / Пер. с англ. В.П. Леонова – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 144 с.: ил. – (Серия «Экзамен на отлично».)
  58. Пономарева, А.А. Взаимосвязь экспрессии генов рецептора CCR5 и хемокина RANTES в лейкоцитах крови с эффективностью неoadьювантной терапии у больных раком молочной железы / А.А. Пономарева, Н.В. Литвяков, Е.Ю. Гарбуков // Науки о человеке: материалы IX конгресса молодых ученых и специалистов / ред. Л.М. Огородова, Л.В. Капилевич. – Томск: СибГМУ, 2008. – 135 с.
  59. Прогнозирование лимфогенного метастазирования и исход заболевания у больных раком молочной железы / Е. М. Слонимская, В. М. Перельмутер, М. В. Завьялова и др // Маммология. – 2007. - № 1. – С. 43-44.
  60. Прогностическое значение комбинации аллельных вариантов генов цитокинов и гемохроматоза у больных хроническим гепатитом С / Л.М. Самоходская, Т.М. Игнатова, С.М. Абдуллаев и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2007. – Т. 17, №2. – С. 50-56.
  61. Проявление резистентности к апоптозу, индуцированному связыванием CD95(FAS) молекул HLA I и II классов,

- мононуклеарными клетками периферической крови больных atopической бронхиальной астмой / И.П. Кайдашев, Я. Гжегорчик, Е. Сморовска и др. // Иммунология. – 2006. - № 1. – С. 13-18.
62. Райхлин, Н. Т. Регуляция и проявления апоптоза в физиологических условиях и в опухолях / Н. Т. Райхлин, А.Н. Райхлин // Вопросы онкологии. – 2002. – Т. 48, № 2. - С. 159-171.
63. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
64. Резникова, Л.С. Комплемент и его значение в иммунологических реакциях / Л.С. Резникова. – М.: Медицина, 1967. – 272 с.
65. Ровенский, Ю.А. Клеточные и молекулярные механизмы опухолевой прогрессии / Ю.А. Ровенский // Биохимия. – 1998. – Т. 63, вып. 9. – С. 1204-1221.
66. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
67. Роль аллельного полиморфизма генов IL4 и IL10 в механизмах хронизации вирусных гепатитов / И.О. Наследникова, Е.В. Белобородова, В.В. Новицкий и др. // Инновации в медицине. Социально значимые инфекционные заболевания: Материалы VIII российско-германской научно-практической конференции / ред. В.В. Степанова, Г. Хана. - Новосибирск: ООО «Альфа Виста», 2009. – С. 161-162.
68. Роль глутатионзависимых пероксидаз в регуляции утилизации липопероксидов в злокачественных опухолях / Э.Г. Горожанская, В.Б. Ларионова, Г.Н. Зубрихина и др. // Биохимия. – 2001. – Т. 66, вып. 2. – С. 273-278.
69. Роль естественных киллерных клеток (CD56, CD16) в местном противоопухолевом иммунитете при раке молочной железы / В. Н.

- Эллиниди, Н. В. Аникеева, О. А. Гончарова, Д. А. Красножон // Вопросы онкологии. – 2005. – Т. 51, - № 4. – С. 447-449.
70. Роль полиморфизма в промоторной области гена TNF в развитии хронической обструктивной болезни лёгких / Г.Н. Сеитова, Е.Б. Букреева, С.В. Буйкин и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2004. – №2. – С. 29-34.
71. Рукавицын, О. А. Роль иммунотерапии в лечении больных заболеваниями системы крови / О. А. Рукавицын // Вопросы онкологии. – 2002. – Т. 48, № 2. – С. 186-192.
72. Сепиашвили, Р. И. Естественные киллеры и их рецепторы, специфичные к МНС-I / Р. И. Сепиашвили, И. П. Балмасова // Иммунология. – 2006. - № 1. – С. 46-51.
73. Система Fas/FasL при новообразованиях желудка и толстой кишки / В. В. Обухова, Н. Н. Белушкина, О. В. Макарова и др. // Молекулярная медицина. – 2004. - № 2. – С. 44-49.
74. Скуинь, Л. М. Иммунологические исследования в онкологической клинике / Л. М. Скуинь, К. П. Кашкин // Новости прикладной иммунологии и аллергологии. – 2001. - №5. – С. 1-3.
75. Современные тенденции иммунотерапии злокачественных опухолей / О.Е. Молчанов, И.А. Попов, В.К. Козлов, М.И. Карелин. – СПб.: Изд-во СПб ГУ, 2001. – 88 с.
76. Сочетанное применение ронколейкина и беталейкина в комплексном лечении онкологических заболеваний / А.М. Попович, М.Н. Смирнов, А.С. Симбирцев, М.И. Карелин // Ронколейкин – новые аспекты клинического применения: материалы конференции. – СПб: МАПО, 1999. – С. 28-34.
77. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека / А.А. Тотолян, И.А. Балдуева, Л.Н. Бубнова и др. // Клинич. лабор. диагностика. – 2001. – № 8. – С. 38-45.

78. Стахеева, М.Н. Роль иммунной системы в патогенезе рака молочной железы при комбинированном лечении: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук / М.Н. Стахеева. – Томск, 2011. – 45 с.
79. Таксаны в неoadъювантной химиотерапии рака молочной железы / А. А. Божок, В. Ф. Семиглазов, А.Е. Клецель и др. // Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52, № 1. – С. 7-14.
80. Тимошина, М.А. Эффективность прекондиционирования у лиц пожилого возраста с острым коронарным синдромом на фоне энтеровирусной инфекции: автореф. дис. ...канд. мед. Наук / М.А. Тимошина. – Санкт-Петербург, 2011. – 21 с.
81. Тупицын, Н.Н. Иммунофенотип рака молочной железы / Н.Н. Тупицын // Рак молочной железы / под ред. Н.Е. Кушлинского, С.М. Портного, К.П. Лактионова. – М.: Изд-во РАМН, 2005. – С. 174-196.
82. Функциональный полиморфизм генов IL10 и TNFA при туберкулёзе лёгких / Е.Л. Никулина, И.О. Наследникова, Н.А. Сухаленцева и др. // XII Российского конгресса молодых ученых с международным участием "Науки о человеке" (Томск, 26-27 мая 2011 г.) / ред. Л.М. Огородова, Л.В. Капилевич. – Томск: СибГМУ, 2011. – 104 с.
83. Хайленко, В.А. Диагностика рака молочной железы / В.А. Хайленко, Д.В. Комова, В.Н. Богатырёва. – М.: Медицинское информационное агентство, 2005. – 240 с.
84. Цитотоксическая активность растворимого Fas-рецептора / О. В. Прусакова, Н. А. Рабая, А. Б. Мошникова и др. // Молекулярная медицина. – 2005. - № 2. – С. 33-41.
85. Шапот, В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста / В.С. Шапот. – М.: Наука, 1975. – 172 с.
86. Шварц, В.Я. Регуляция метаболических процессов интерлейкином 6 / В.Я. Шварц // Цитокины и воспаление. – 2009. Т. 8. – №3. – С. 3-10.

87. Швембергер, И. Н. Апоптоз: роль в нормальном онтогенезе и патологии / И. Н. Швембергер, Л. Б. Гинкул // Вопросы онкологии. – 2002. – Т. 48, № 2. – С. 153-158.
88. Ширшев, С.В. Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций / С.В. Ширшев // Усп. совр. биол. – 1993. – Т. 113, вып. 2. – С. 230-246.
89. Ширшев, С.В. Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия хорионического гонадотропина / С.В. Ширшев // Усп. совр. биол. – 1998. – Т. 118, вып. 1. – С.69-85.
90. Шпаков, А.О. Роль сульфгидрильных групп в функционировании аденилатциклазной системы / А.О. Шпаков // Журнал эволюц. биохим. и физиол. – 2002. – Т. 38, №1. – С. 87-107.
91. Ярилин, А. А. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор Foxp-3 / А. А. Ярилин, А. Д. Донецкова // Иммунология. – 2006. - № 3. – С. 176-188.
92. Ярилин, А.А. Основы иммунологии / А.А. Ярилин. – М.: Медицина, 1999. – 608 с.
93. -509C>T polymorphism in the TGF-beta1 gene promoter, impact on the hepatocellular carcinoma risk in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection / P. Qi, Y.M. Chen, H. Wang // Cancer Immunol Immunother. – 2009. – Vol. 58, №9. – P. 1433-1440.
94. 5-fluorouracil-based chemotherapy enhances the antitumor activity of a thymidylate synthase-directed polyepitopic peptide vaccine / P. Correale, M.T. Del Vecchio, G. Di Genova et al. // J Natl Cancer Inst. – 2005. – Vol. 97, №19. – P. 1437-1445.
95. A common functional polymorphism (C-->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha / T. Skoog, F.M. van't Hoof, B. Kallin et al. // Hum Mol Genet. – 1999. – Vol. 8, №8. – P. 1443-1449.

96. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance / J. Taieb, N. Chaput C. Ménard // *Nat Med.* – 2006. – Vol. 12, № 2. – P. 214-219.
97. A push-pull approach to maximize vaccine efficacy: abrogating suppression with an IL-13 inhibitor while augmenting help with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and CD40L / J.D. Ahlers, I.M. Belyakov, M. Terabe et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2002. – Vol. 99, №20. – P. 13020-13025.
98. A randomized phase II study of concurrent docetaxel plus vaccine versus vaccine alone in metastatic androgen-independent prostate cancer / P.M. Arlen, J.L. Gulley, C. Parker et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 1260–1269.
99. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer / P. Farmer, H. Bonnefoi, P. Anderle et al. // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15, №1. – P. 68-74.
100. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro / F. Pociot, J. Mølviq, L. Wogensen et al // *Eur J Clin Invest.* -1992. - Vol. 22, № 6. – P. 396-402.
101. Accelerated CD8<sup>+</sup> T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination / V.P. Badovinac, K.A. Messingham, A. Jabbari et al. // *Nat Med.* – 2005. – Vol. 11, №7. – P. 748-756.
102. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors / F. Ghiringhelli, L. Apetoh, A. Tesniere et al // *Nat Med.* – 2009. - Vol. 15, №10. – P. :1170-1178.
103. Activation of tumor-associated macrophages by the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid induces an effective CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated antitumor immune response in murine models of lung cancer and mesothelioma / A.S. Jassar, E. Suzuki, V. Kapoor et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, №24. – P. 11752-11761.



104. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma / M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, J.C. Yang // *J Clin Oncol.* – 2005. – Vol. 23, №10. – P. 2346-2357.
105. Aggraval, B.B. Tumor necrosis factor: developments during the last decade / B.B. Aggraval, K. Natarajan // *Eur. Cytokine Network.* – 1996. – Vol. 7, №2. – P. 93-124.
106. An aggressive nasal lymphoma accompanied by high levels of soluble Fas ligand / K. Sato, F. Kimura, Y. Nakamura et al. // *Br. J. Hematol.* – 1996. – Vol. 94. – P. 379-382.
107. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family / P. Chomez, O. De Backer, M. Bertrand et al. // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61, №14. – P. 5544-5551.
108. Anderson, K.M. Heat, heat shock, heat shock proteins and death: a central link in innate and adaptive immune responses / K.M. Anderson, P.K. Srivastava // *Immunol. Lett.* – 2000. – Vol. 74, №1. – P. 35-39.
109. Angiogenesis-associated sequence variants relative to breast cancer recurrence and survival / L.R. Kidd, G.N. Brock, T.T. VanCleave et al. // *Cancer Causes Control.* – 2010. – Vol. 21, №10. – P. 1545-1557.
110. Anti-idiotypic antibodies can induce long-term complete remissions in non-Hodgkin's lymphoma without eradicating the malignant clone / T.A. Davis, D.G. Maloney, D.K. Czerwinski et al. // *Blood.* – 1998. – Vol. 92, №4. – P. 1184-1190.
111. Apoptosis resistant bronchoalveolar lavage (BAL) fluid lymphocytes in sarcoidosis / H. Stridh, A. Planck, D. Gigliotti et al. // *Thorax.* - 2002. - Vol. 57. - P. 897–901.
112. Apostolopoulos, V. MUC1 and breast cancer / V. Apostolopoulos, G.A. Pietersz, I.F. McKenzie // *Curr. Opin. Mol. Ther.* – 1999. – Vol. 1, №1. – P. 98-103.

113. Arinaga, S. Augmentation of the generation of cell-mediated cytotoxicity after a single dose of adriamycin in cancer patients / S. Arinaga, T. Akiyoshi, H. Tsuji // *Cancer Res.* – 1986. – Vol. 46, № 8. – P. 4213–4216.
114. Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese / M. Yokota, S. Ichihara, T.L. Lin et al. // *Circulation.* – 2000. – Vol. 101, №24. – P. 2783-2787.
115. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity / Z. Qin, G. Richter, T. Schüler et al. // *Nat Med.* – 1998. – Vol. 4, №5. – P. 627-630.
116. Bacacs T. Breast and other cancer dormancy as a therapeutic endpoint: speculative recombinant T cell receptor ligand (RTL) adjuvant therapy worth considering?/ T. Bacacs, J. N. Mehrishi // *BMC Cancer.* – 2010. – Vol. 10. – P. 251-256.
117. Baguley, B. C. Antivascular therapy of cancer: DMXAA / B. C. Baguley // *Lancet Oncol.* – 2003. – Vol. 4, № 3. – P. 141–148.
118. Balkwill, F. Cytokine amplification and inhibition of immune and inflammatory responses / F. Balkwill // *J. Viral Hepatitis.* – 1997. - №4, suppl. 2. – P. 6-15.
119. Balkwill, F. Inflammation and cancer: back to Virchow? / F. Balkwill, A. Mantovani // *Lancet.* – 2001. – Vol. 357. – P. 539-545.
120. Balkwill, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? / F. Balkwill // *Cytokine Growth Factor Review.*- 2002.- Vol. 13. - P. 135-141.
121. Beasley, G.M. What's new in neoadjuvant therapy for breast cancer? / G.M. Beasley, J.A. Jr. Olson // *Adv. Surg.* – 2010. – Vol. 44. – P. 199-228.
122. Berd, D. Effect of low dose cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: depletion of CD4+, 2H4+ suppressor-inducer T-cells / D. Berd, M.J. Mastrangelo // *Cancer Res.* – 1988. – Vol. 48, №6. – P. 1671–1675.
123. Berd, D. Induction of cell-mediated immunity to autologous melanoma cells and regression of metastases after treatment with a melanoma cell vaccine

- preceded by cyclophosphamide / D. Berd, H.C. Maguire Jr., M.J. Mastrangelo // *Cancer Res.* – 1986. – Vol. 46, №5. – P. 2572–2577.
124. Berinstein, N. Overview of therapeutic vaccination approaches for cancer / N. Berinstein // *Semin. Oncol.* – 2003. – Vol. 3, suppl. 8. – P. 1-8.
125. Binder, R. J. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells / R. J. Binder, P. K. Srivastava // *Nature Immunol.* – 2005. – Vol. 6, № 6. – P. 593–599.
126. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications / R. Spisek, A. Charalambous, A. Mazumder et al. // *Blood.* – 2007. – Vol. 109, № 11. – P. 4839-4845.
127. Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow / A. Boyum // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1968. – Vol. 21. – Suppl. 97. – P. 1-9.
128. Bukowski, R.M. Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma: the role of interleukin-2 / R.M. Bukowski // *Cancer.* – 1997. – Vol. 80. – P. 1198-1220.
129. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death / M. Obeid, A. Tesniere, F. Ghiringhelli et al. // *Nat Med.* – 2007. – Vol. 13, №1. – P. 54-61.
130. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis / M. Obeid, T. Panaretakis, N. Joza et al. // *Cell Death Differ.* – 2007. – Vol. 14, № 10. – P. 1848-1850.
131. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes / M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, P.F. Robbins et al. // *Science.* – 2002. – Vol. 298, №5594. – P. 850-854.
132. Cancer-testis antigens and ING1 tumor suppressor gene product are breast cancer antigens: characterization of tissue-specific ING1 transcripts and a

- homologue gene / D. Jäger, E. Stockert, M.J. Scanlan et al. // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59, №24. – P. 6197-6204.
133. Caruso, R.A. Neutrophil interaction with tumour cells in small early gastric cancer: ultrastructural observations / R.A. Caruso, G. Speciale, C. Inferrera // *Histol. Histopathol.* – 1994. – Vol. 9, №2. – P. 295-303.
134. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death / N. Casares, M.O. Pequignot, A. Tesniere et al. // *J Exp Med.* – 2005. – Vol. 202, №12. – P. 1691-1701.
135. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner / S. Mañes, E. Mira, R. Colomer et al. // *J Exp Med.* – 2003. – Vol. 198, №9. – P. 1381-1389.
136. CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4<sup>+</sup> T cells with IFN- $\gamma$ -dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination / N. Casares, L. Arribillaga, P. Sarobe et al. // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171, №11. – P. 5931-5939.
137. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- $\beta$ -dependent manner / F. Ghiringhelli, C. Ménard, M. Terme et al. // *J Exp Med.* – 2005. – Vol. 202, №8. – P. 1075-1085.
138. CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and post-translational modulations / S. Tauzin, L. Debure, J.F. Moreau, P. Legembre // *Cell Mol. Life Sci.* – 2011. – Nov.1.
139. Cell-based vaccines for the stimulation of immunity to metastatic cancer / S. Ostrand-Rosenberg, B.A. Pulaski, V.K. Clements et al. // *Immunol. Rev.* – 1999. – Vol. 170. – P. 101-114.
140. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte / S.J. Gardai, K.A. McPhillips, S.C. Frasch et al. // *Cell.* – 2005. – Vol. 123, № 2. – P. 321-334.

141. Cellular immunity in breast cancer patients completing taxane treatment. / W.E. Carson 3rd, C.L. Shapiro, T.R. Crespin et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10, №10. – P. 3401–3409.
142. Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients / P. Correale, M.G. Cusi, K.Y. Tsang et al. // *J Clin Oncol.* – 2005. – Vol. 23, №35. – P. 8950-8958.
143. Clinicopathological and genomics predictors of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer / A. Frati, B. Lesieur, A. Benbara et al. // *Gynecol. Obstet. Fertil.* – 2010. – Vol. 38(7-8). – P. 475-480.
144. Combination of imatinib mesylate with autologous leukocyte-derived heat shock protein and chronic myelogenous leukemia / Z. Li, Y. Qiao, B. Liu et al. // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, №12. – P. 4460-4468.
145. Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer / S.J. Antonia, N. Mirza, I. Fricke et al. // *Clin Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12(3 Pt 1). – P. 878-887.
146. Connective tissue stromal changes in tumours and tumour-like lesions of the breast / M.R. Pai, K.N. Pai, R.V. Rao et al. // *Indian J. Pathol. Microbiol.* – 1999. – Vol. 42, №3. – P. 327-332.
147. Correlation of stress factors with sustained depression of natural killer cell activity and predicted prognosis in patients with breast cancer / S. Levy, R. Herberman, M. Lippman, T. d'Angelo // *J Clin Oncol.* – 1987. – Vol. 5, № 3. – P. 348-353.
148. CpG oligodeoxynucleotide enhances tumor response to radiation / L. Milas, K.A. Mason, H. Ariga et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, №15. – P. 5074-5077.
149. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of

- chemoimmunotherapy of cancer / G. Schiavoni, F. Mattei, T. Di Pucchio // *Blood*. - . - 2000. - Vol. 95, №6. - P.2024-2030.
150. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice / J.P. Machiels, R.T. Reilly, L.A. Emens et al. // *Cancer Res*. - 2001. - Vol. 61, №9. - P. 3689-3697.
151. Cytochrome c and ATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade / P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo et al. // *Cell*. - 1997. - Vol. 91. - P. 479-489.
152. DeNardo, D.G. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity / D.G. DeNardo, P. Andreu, L.M. Coussens // *Cancer Metastasis Rev*. - 2010. - Vol. 29, №2. - P. 309-316.
153. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo / N.C. Fernandez, A. Lozier, C. Flament et al. // *Nat Med*. - 1999. - Vol. 5, № 4. - P. 405-411.
154. Dinarello C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease / C.A. Dinarello // *Blood*. - 1996. - Vol. 87. - P. 2095-2147.
155. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor / M. Loeffler, E. Daugas, S.A. Susin et al. // *FASEB J*. - 2001. - Vol. 15. - P. 758-767.
156. Downregulation of Fas ligand by shedding / M. Tanaka, T. Itai, M. Adachi, S. Nagata // *Nat Med*. - 1998. - Vol. 4, № 1. - P. 31-36.
157. Dranoff, G. Immune recognition and tumor protection / G. Dranoff // *Curr. Opin. Immunol*. - 2002. - Vol. 14, №2. - P. 161-164.
158. Drug- and cell-mediated antitumor cytotoxicities modulate cross-presentation of tumor antigens by myeloid dendritic cells / A. Galetto, S. Buttiglieri, S. Forno et al. // *Anticancer Drugs*. 2003 - Vol. 14, №10. - P. 833-843.

159. Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy / M. Obeid, A. Tesniere, T. Panaretakis et al. // *Immunol Rev.* – 2007. – Vol. 220, Issue 1. – P. 22-34.
160. Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas / J.M. Plate, A.E. Plate, S. Shott et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2005. – Vol. 54, №9. – P. 915–925.
161. Effect of radiation on the expression of carcinoembryonic antigen on the membranes of human gastric adenocarcinoma cells--immunological study using monoclonal antibodies / M. Hareyama, K. Imai, T. Ban et al. // *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi.* – 1988. – Vol. 48, №12. – P. 1572-1574.
162. Effective chemo-immunotherapy of L1210 leukemia in vivo using interleukin-12 combined with doxorubicin but not with cyclophosphamide, paclitaxel or cisplatin / R. Zagodzón, J. Gołab, T. Stokłosa et al. // *Int J Cancer.* – 1998. – Vol. 77, №5. – P. 720-727.
163. Effective combination of chemotherapy and dendritic cell administration for the treatment of advanced-stage experimental breast cancer / B. Yu, S. Kusmartsev, F. Cheng et al. // *Clin Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9, №1. – P. 285-294.
164. Efficacy of GM-CSF-producing tumor vaccine after docetaxel chemotherapy in mice bearing established Lewis lung carcinoma / Y. Chu, L.X. Wang, G. Yang et al. // *J Immunother.* – 2006. – Vol. 29, №4. – P. 367-380.
165. Ehrlich, P. *Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung* / P. Ehrlich. – Berlin: Verlag von August Hirschwald, 1904. – 776 S.
166. Elson, P.J. Prognostic factors for survival in patients with recurrent or metastatic renal cell carcinoma / P.J. Elson, R.S. Witte, D.L. Trump // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 48. – P. 7310-7313.
167. Endotoxin up-regulates interleukin-18: potential role for gram-negative colonization in sarcoidosis / D.M. Kelly, C.M. Greene, G. Meachery et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2005. – Vol. 172, №10. – P. 1299-1307.

168. Enhanced antitumor effect of recombinant human tumor necrosis factor in combination with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in BALB/c mice / M. Maeda, N. Watanabe, N. Tsuji et al. // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1993. – Vol. 84, №8. – P. 921-927.
169. Enhancing the effect of THERATOPE STn–KLH cancer vaccine in patients with metastatic breast cancer by pretreatment with low-dose intravenous cyclophosphamide / G.D. MacLean, D.W. Miles, R.D. Rubens et al. // *J. Immunother. Emphasis Tumor. Immunol.* – 1996. – Vol. 19, №4. – P. 309–316.
170. Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand / V.M. Abrahams, S.L. Straszewski M. Kamsteeg et al. // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63, №17. – P. 5573-5581.
171. Evidence that alpha-fetoprotein suppresses the immunological function in transgenic mice / T. Yamashita, A. Nakane, T. Watanabe et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1994. – Vol. 201, №3. – P. 1154-1159.
172. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas / T. Sato, S. Irie, S. Kitada, J.C. Reed // *Science.* – 1995. – Vol. 268, № 5209. – P. 411-415.
173. Fas and Fas ligand in gut and liver / M.J. Pinkoski, T. Brunner, D.R. Green, T. Lin // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2000. – Vol. 278, №3. – P. G354-G366.
174. FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer / T. Sun, Y. Zhou, H. Li et al. // *J Exp Med.* – 2005. – Vol. 202, № 7. – P. 967-974.
175. Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors / N. Mitsiades, V. Poulaki, A. Leone, M. Tsokos // *J Natl Cancer Inst.* – 1999. – Vol. 91. – P. 1678-1684.
176. Finn, O.J. Cancer vaccines: between the idea and the reality / O.J. Finn // *Nature Reviews Immunology.* - 2003. – Vol. 3, № 8. – P. 630-641.



177. First-line, single-agent Herceptin(trastuzumab) in metastatic breast cancer: a preliminary report / C. Vogel, M.A. Cobleigh, D. Tripathy et al. // *Eur J Cancer*. – 2001. – Vol. 37 Suppl 1:S25-S29.
178. Fujimura, T. Neutrophil-mediated tumor cell destruction in cancer ascites. II. A OK-432 attracts killer neutrophils through activation of complement C5 / T. Fujimura, M. Torisu // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1987. – Vol. 43, №2. – P. 174-184.
179. Functional variants in the promoter of interleukin-1beta are associated with an increased risk of breast cancer: a case-control analysis in a Chinese population / J. Liu, X. Zhai, G. Jin et al // *Int J Cancer*. – 2006. - Vol. 118, № 10. – P. 2554- 2558.
180. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity / E. Suzuki, V. Kapoor, A.S. Jassar et al. // *Clin Cancer Res*. – 2005. – Vol. 11, №18. – P. 6713-6721.
181. Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines / M.L. Disis, T.A. Gooley, K. Rinn et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol. 20, №11. – P. 2624-2632.
182. Genetic polymorphisms of interleukin-1 beta (IL-1B) and IL-1 receptor antagonist (IL-1RN) and breast cancer risk in Korean women /K. M. Lee, S. K. Park, N. Hamajima et al // *Breast Cancer Res Treat.* – 2006. - Vol. 96, № 2. – P. :197- 202.
183. Glaser, M. Regulation of specific cell-mediated cytotoxic response against SV40-induced tumor associated antigens by depletion of suppressor T cells with cyclophosphamide in mice / M. Glaser // *J. Exp. Med.* . – 1979. – Vol. 149. – P. 774–779.
184. Global cancer statistics. / A. Jemal, F Bray, M. M. Center et al // *CA Cancer J Clin.* – 2011. Vol. 61, № 2. – P. 69-90.

185. Gonzalez-Angulo, A.M. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer / A.M.Gonzalez-Angulo, F. Morales-Vasquez, G.N. Hortobagyi // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2007. – Vol. 608. – P. 1-22.
186. Grivennikov, S.I. Immunity, inflammation, and cancer / S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin // *Cell.* – 2010. – Vol. 140, №6. – P. 883-899.
187. Hafeman, D.G. Polymorphonuclear leukocyte-mediated, antibody-dependent, cellular cytotoxicity against tumor cells: dependence on oxygen and the respiratory burst / D.G. Hafeman, Z.J. Lucas // *J. Immunol.* – 1979. – Vol. 123, №1. – P. 55-62.
188. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144, №5. – P. 646-674.
189. Harris, M. *Medical statistics made easy* / M. Harris, G. Taylor. – London: Taylor and Francis, 2006. – 114 p.
190. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome / H.M. Beere, B.B. Wolf, K. Cain et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 2, № 8. – P. 469-475.
191. Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8 T cells / C. Wrzesinski, C.M. Paulos, L. Gattinoni et al. // *J Clin Invest.* – 2007. – Vol. 117, №2. – P. 492-501.
192. Hui, K. Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation / K. Hui, F. Grosveld, H. Festenstein // *Nature.* – 1984. – Vol. 311. – P. 750-752.
193. Hulkkonen, J. A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 beta plasma levels in healthy individuals / J. Hulkkonen, P. Laippala, M. Hurme // *Eur Cytokine Netw.* – 2000. - Vol. 11, № 2. – P. 251- 255.
194. Human neutrophil-mediated lysis of ovarian cancer cells / A. Lichtenstein, M. Seelig, J. Berek, J. Zigelboim // *Blood.* – 1989. – Vol. 74, №2. – P. 805-809.

195. Identification of cyclin B1 as a shared human epithelial tumor-associated antigen recognized by T cells / H. Kao, J.A. Marto, T.K. Hoffmann et al. // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 194, №9. – P. 1313-1323.
196. IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas / J.S. Wolf, Z. Chen, G. Dong et al // *Clin Cancer Res.* – 2001. - Vol. 7, № 6. – P. 1812-1820.
197. IL-10 elicits IFN $\gamma$ -dependent tumor immune surveillance / J.B. Mumm, J. Emmerich, X. Zhang et al. // *Cancer Cell.* - 2011. - Vol. 20, №6. - P. 781-796.
198. IL-10 polymorphism associated with decreased risk for mortality after burn injury / R.M. Huebinger, F. Rivera-Chavez, L.Y. Chang et al. // *J Surg Res.* – 2010. – Vol. 164, №1. – P. 141-145.
199. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis / S. Fichtner-Feigl, W. Strober, K. Kawakami et al. // *Nat Med.* – 2006. – Vol. 12, № 1. – P. 99-106.
200. IL-2- or IL-15-activated NK cells enhance Cetuximab-mediated activity against triple-negative breast cancer in xenografts and in breast cancer patients / M.P. Roberti, Y.S. Rocca, M. Amat et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2012. – Oct. №14.
201. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases / S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano et al. // *J. Immunol.* – 1995/ - Vol. 155, №3. – P. 1151–1164.
202. Immunological aspects of cancer chemotherapy / L. Zitvogel, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, G. Kroemer // *Nature Reviews Immunology.* – 2008. – Vol. 8, №1. 59-73.
203. Immunological evaluation of individualized peptide vaccination with a low dose of estramustine for HLA-A24+ HRPC patients / M. Noguchi, K. Itoh, A. Yao et al. // *Prostate.* – 2005. – Vol. 63. – P. 1–12.

204. Immunomodulatory properties of antineoplastic drugs administered in conjunction with GM-CSF-secreting cancer cell vaccines / A. Nigam, R.F. Yacavone, M.L. Zahurak et al. // *Int J Oncol.* – 1998. – Vol. 12, №1. – P. 161-170.
205. In contrast to effector T cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death / B. Fritzsching, N. Oberle, N. Eberhardt et al. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175. – P. 32-36.
206. In vitro killing of neuroblastoma cells by neutrophils derived from granulocyte colony-stimulating factor-treated cancer patients using an anti-disialoganglioside/anti-Fc gamma RI bispecific antibody / J. Michon, S. Moutel, J. Barbet et al. // *Blood.* – 1995. – Vol. 86, №3. – P. 1124-1130.
207. In vivo characterization and modulation of the glutathione/glutathione S-transferase system in cancer patients / T.M. Mulders, H.J. Keizer, D.D. Breimer, G.J. Mulder // *Drug Metab Rev.* – 1995. – Vol. 27. – P. 191-229.
208. Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go? / P. Muranski, A. Boni, C. Wrzesinski et al. // *Nat Clin Pract Oncol.* – 2006. – Vol. 3, №12. – P. 668-681.
209. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells / A.K. Nowak, R.A. Lake, A.L. Marzo et al. // *J Immunol.* – 2003. – Vol. 170, №10. – P 4905-4913.
210. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus / S. Miyazoe, K. Hamasaki, K. Nakata et al. // *Am J Gastroenterol.* – 2002. – Vol. 97, №8. – P. 2086-2092.
211. Inhibition of CD4<sup>(+)</sup>25<sup>+</sup> T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide / M.E. Lutsiak, R.T. Semnani, R. De Pascalis et al. // *Blood.* – 2005. – Vol. 105, №7. – P. 2862-2868.

212. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/ lysosomes in macrophages / A. Shiratsuchi, I. Watanabe, O. Takeuchi et al. // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, № 4. – P. 2039–2047.
213. Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis / A. Bozzi, B.S. Reis, P.P. Pereira et al. // *Cytokine.* – 2009. – Vol. 48, №3. – P. 2-7.
214. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma / H.D. Shin, B.L. Park, L.H. Kim et al. // *Hum Mol Genet.* – 2003. – Vol. 12, №8. – P. 901-906.
215. Interleukin 12-based immunotherapy improves the antitumor effectiveness of a low-dose 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment in L1210 leukemia and B16F10 melanoma models in mice / K. Kozar, R. Kamiński, T. Switaj et al. // *Clin Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9, №8. – P. 3124-3133.
216. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma / E. Lech-Maranda, L. Baseggio, J. Bienvenu et al. // *Blood.* – 2004. – Vol. 103, № 9. – P. 3529-3534.
217. Interleukin-10 promoter polymorphisms associated with susceptibility to lumbar disc degeneration in a Chinese cohort / W.P. Lin, J.H. Lin, X.W. Chen et al. // *Genet Mol Res.* – 2009. – Vol. 10, №3. – P. 1719-1727.
218. Interleukin-18 single nucleotide polymorphisms contribute to the susceptibility to brucellosis in Iranian patients / M. Rasouli, M. Kalani, A. Moravej, S. Kiany // *Cytokine.* – 2011. – Vol. 54, № 3. – P 272-276.
219. Interleukin-1alpha protein secretion in breast cancer is associated with poor differentiation and estrogen receptor alpha negativity / C. F. Singer, G. Hudelist, D. Gschwantler-Kaulich et al // *Int J Gynecol Cancer.* – 2006. Vol. 16, Suppl 2. – P. :556-559.
220. Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo / F. Tanaka, H. Yamaguchi, M. Ohta et al. // *Int J Cancer.* – 2002. – Vol. 101, №3. – P. 265-269.

221. Isolated limb perfusion for malignant melanoma: systematic review on effectiveness and safety / D. Moreno-Ramirez, L. de la Cruz-Merino, L. Ferrandiz // *Oncologist*. – 2010. Vol. 15, №4. – P. :416- 427.
222. Kelland, L. R. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development / L. R. Kelland // *Eur. J. Cancer*. – 2004. – Vol. 40, №6. – P. 827–836.
223. Lake, R. A. Immunotherapy and chemotherapy — a practical partnership / R. A. Lake, B. W. Robinson // *Nature Rev. Cancer*. – 2005. – Vol. 5, № 5. – P. 397–405.
224. Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro / M.H. Gaugler, C. Squiban, A. van der Meeren et al. // *Int J Radiat Biol*. – 1997. – Vol. 72, №2. – P. 201-209.
225. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy / D.G. DeNardo, D.J. Brennan, E. Rexhepaj et al. // *Cancer Discov*. – 2011. – Vol. 1, №1. – P. 54-67.
226. Lowin-Kropf, B. Positive impact of inhibitory Ly49 receptor-MHC class I interaction on NK cell development / B. Lowin-Kropf, W. Held // *J Immunol*. – 2000. – Vol. 165. – P. 91-95.
227. Lubbert, M. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action / M. Lubbert // *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. – 2000 . – Vol. 249. – P. 135–164.
228. Mammaglobin-A is a tumor-associated antigen in human breast carcinoma / Y. Tanaka, K.D. Amos, T.P. Fleming et al. // *Surgery*. – 2003. – Vol. 133, №1. – P. 74-80.
229. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients / F. Ghiringhelli, C. Menard, P.E. Puig et al. // *Cancer Immunol Immunother*. – 2007. – Vol. 56, №5. – P. 641-648.

230. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells via TLR4 signaling / C.M. Paulos, C. Wrzesinski, A. Kaiser et al. // *J Clin Invest.* – 2007. – Vol. 117, №8. – P. 2197-2204.
231. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma / S. Nomoto, K. Yamashita, K. Koshikawa et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – Vol. 8, №5. – P. 481-487.
232. Natural killer clones recognize specific soluble HLA class I molecules / E. Carbone, G. Terrazzano M. Colonna et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1996. – Vol. 26. – P. 683-689.
233. Neoadjuvant chemotherapy in women with large and locally advanced breast cancer: chemoresistance and prediction of response to drug therapy / S. Chuthapisith, J.m. Eremin, M. El-Sheemy, O. Eremin // *Surgeon.* – 2006. – Vol. 4(4). – P. 211-219.
234. Nimmerjahn, F. Antibodies, Fc receptors and cancer / F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch // *Curr. Opin. Immunol.* – 2007. – Vol. 19, №2. – P. 239–245.
235. North, R.J. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. / R.J.North // *J. Exp. Med.* – 1982. – Vol. 155, №4. – P. 1063–1074.
236. Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects / C. Borg, M. Terme, J. Taïeb et al. // *J Clin Invest.* – 2004. – Vol. 114, № 3. – P. 379-388.
237. Nowak, A. K. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemoimmunotherapy / A. K. Nowak, B. W. Robinson, R. A.Lake // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62, № 8. – P. 2353–2358.
238. Nowak, A. K. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors / A. K. Nowak, B. W. Robinson, R. A. Lake // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63, № 15. – P. 4490–4496.

239. Orimo, A. Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors / A. Orimo, R.A. Weinberg // *Cancer Biol. Ther.* – 2007. – Vol. 6, №4. – P. 618-619.
240. Orimo, A. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type / A. Orimo, R.A. Weinberg // *Cell Cycle.* – 2006. – Vol. 5, №15. – P. 1597-1601.
241. Orsini, F. Increased primary cell-mediated immunity in culture subsequent to adriamycin or daunorubicin treatment of spleen donor mice / F. Orsini, Z. Pavelic, E. Mihich // *Cancer Res.* – 1977. – Vol. 37, №6. – P. 1719–1726.
242. Phase I study of gemcitabine given weekly as a short infusion for non-small cell lung cancer: results and possible immune system-related mechanisms / M.L. Levitt, B. Kassem, W.E. Gooding et al. // *Lung Cancer.* – 2004. – Vol. 43, №3. – P. 335-344.
243. Place, A.E. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment / A.E. Place, S.J. Huh, K. Polyak // *Breast Cancer Research.* – 2011. – Vol. 13, №6. – P. 227.
244. Polyak K. Progress in breast cancer research / K. Polyak, P.K. Vogt // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. – Vol.109. – P.2715-2717.
245. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese / T. Higuchi, N. Seki, S. Kamizono et al. // *Tissue Antigens.* – 1998. – Vol. 51, №6. – P. 605-612.
246. Polymorphisms in the interleukin-1 gene influence the stratum corneum interleukin-1 alpha concentration in uninvolved skin of patients with chronic irritant contact dermatitis / C.M. de Jongh, L. Khrenova, S. Kezic // *Contact Dermatitis.* – 2008. – Vol. 58, №5. P. 263-268.
247. Polymorphisms of interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-10, and IL-18 and the risk of ovarian cancer / A.W. Bushley, R. Ferrell, K. McDuffie et al. // *Gynecol Oncol.* – 2004. – Vol. 95, № 3. – P. 672-679.
248. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple



- myeloma / K. Neben, J. Mytilineos, T.M. Moehler et al. // *Blood*. – 2002. – Vol. 100, №6. – P. 2263-2265.
249. Prerequisites for the antitumor vaccine-like effect of chemotherapy and radiotherapy / D. Hannani, A. Sistigu, O. Kepp et al. // *Cancer J*. 2011. – Vol.17, № 5. – P. 351-358.
250. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells / S. Somersan, M. Larsson, J.F. Fonteneau et al. // *J Immunol*. – 2001. – Vol. 167, № 9. P – 4844-4852.
251. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms among Iranian patients with asthma / S.A. Mahdavian, N. Rezaei, B. Moradi et al. // *J Clin Immunol*. – 2009. – Vol. 29, №1. – P.57-62.
252. Qian, B.Z. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis / B.Z. Qian, J.W. Pollard // *Cell*. – 2010. – Vol. 141, №1. – P. 39-51.
253. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy / E.A. Reits, J.W. Hodge, C.A. Herberts et al. // *J Exp Med*. – 2006. – Vol. 203, №5. – P. 1259-1271.
254. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group / G. Riethmüller, E. Schneider-Gädicke, G. Schlimok et al. // *Lancet*. – 1994. – Vol. 343(8907). – P. 1177-1183.
255. Ravindranath, M.H. Attachment of monophosphoryl lipid A (MPL) to cells and liposomes augments antibody response to membrane-bound gangliosides / M.H. Ravindranath, D.L. Morton, R.F. Irie // *J. Autoimmunol*. – 1994. – Vol. 7. – P. 803-816.
256. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells / L. Gattinoni, S.E. Finkelstein, C.A. Klebanoff et al. // *J Exp Med*. – 2005. – Vol. 202, №7. – P. 907-912.

257. Restifo, N.P. Cancer vaccines: basic principles. General concepts and preclinical studies / N.P. Restifo // Principles and practice of the biologic therapy of cancer / S.A. Rosenberg Ed. – Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2000. – P. 571-583.
258. Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment / A. Serrano, S. Tanzarella, I. Lionello et al. // Int J Cancer. – 2001. – Vol. 94, №2. – P. 243-251.
259. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self / S. Sakaguchi // Nat. Immunol. – 2005. – Vol. 6, №4. – P. 345-352.
260. Salgaller, M.L. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer / M.L. Salgaller, P.A. Lodge // J. Surg. Oncol. – 1998. – Vol. 68, №2. – P. 122-138.
261. Sculachev V.P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades / V.P. Sculachev // FEBS Lett. – 1998. – Vol. 423. – P. 275-280.
262. Sedlacek, H.H. Vaccination for treatment of tumors: a critical comment / H.H. Sedlacek // Crit. Rev. Oncogenesis. – 1994. – Vol. 5. – P. 555-587.
263. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas / W. Xue, L. Zender, C. Miething et al. // Nature. – 2007. – Vol. 445, №7128. – P. 656-660.
264. Sepah, S. C. Positive affect and inflammation during radiation treatment for breast and prostate cancer / S. C. Sepah, J. E. Bower // Brain Behav Immun. – 2009. - Vol. 23, №8. – P. :1068 - 1072.
265. Serum biomarker profiles and response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer / B.M. Nolen, J.R. Marks, S. Ta`san et al. // Breast Cancer Res. – 2008. – Vol. 10, №3. – R45.
266. Several genes contribute to the production of autoreactive B and T cells in the murine lupus susceptibility locus / Y. Chen, D. Perry, S.S. Boackle et al. // J. Immunol. – 2005. – Vol. 175. – P. 1080-1089.

267. sFas levels increase in response to cisplatin-based chemotherapy in lung cancer patients / E. Ulukaya, C. Acilan, M. Yilmaz et al. // *Cell Biochem. Funct.* – 2010. – Vol. 28. - №7. – P. 565-570.
268. Shimizu, J. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity / J. Shimizu, S. Yamazaki, S. Sakaguchi // *Immunol.* – 1999. – Vol. 163. – P. 5211–5218.
269. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta) / F. S. di Giovine, E. Takhsh, A. I. Blakemore, G. W. Duff // *Hum Mol Genet.*- 1992.- Vol. 1, № 6. – P. 450.
270. Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction / G.M. Spaggiari, P. Contini, A. Dondero et al. // *Blood.* – 2002. – Vol. 100. – P. 4098-4107.
271. Soluble HLA class I molecules/CD8 ligation trigger apoptosis of CD8+ cells by Fas/Fas-ligand interaction / F. Puppo, P. Contini, M. Ghio, F. Indiveri // *Scientific World Journal.* – 2002. – Vol. 12, №2. – P. 421-423.
272. Spiegelman, B.M. Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF alpha / B.M. Spiegelman, G.S. Hotamisligil // *Cell.* – 1993. – Vol. 73. – P. 1-23.
273. Srivastava, P. K. Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-peptide complexes / P. K. Srivastava // *Curr. Oncol. Rep.* – 2005. – Vol. 7, №2. – P. 104–108.
274. Strategies for the development of recombinant vaccines for the immunotherapy of breast cancer / J. Schlom, J. Kantor, S. Abrams et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 1996. – Vol. 38, №1. – P. 27-39.
275. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer / G. Finak, N. Bertos, F. Pepin et al. // *Nat. Med.* – 2008. – Vol. 14, №5. – P. 518-527.
276. Study on the relationship between polymorphism sites of IL-10 and the susceptibility of endometriosis / B.S. He, J.Y. Xie, Y.Q. Pan et al. // *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* – 2010. – Vol. 44, №7. – P. 602-606.

277. Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes / C.T. Garnett, C. Palena, M. Chakraborty et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, №21. – P. 7985-7994.
278. Swann, J.B. Immune surveillance of tumors / J.B. Swann, M.J. Smyth // *J Clin Invest.* 2007. - Vol. 117, №5. - P. 1137-1146.
279. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses / R.P. Suttmuller, L.M. van Duivenvoorde, A. van Elsas et al. // *J Exp Med.* – 2001. – Vol. 194, №6. – P. 823-832.
280. Synthesis of hsp-70 is enhanced in glutathione-depleted Hep G2 cells / M.L. Freeman, E. Sierra-Rivera, G.J. Voorhees et al. // *Radiat. Res.* – 1993. – Vol. 135. – P. 387-393.
281. Terabe, M. Immunoregulatory T cells in tumor immunity / M. Terabe, J.A. Berzofsky // *Curr. Opin. Immunol.* – 2004. – Vol. 16, №2. – P. 157–162.
282. TGF- $\beta$ 1 Variants in Chronic Beryllium Disease and Sarcoidosis / A.C. Jonth, L. Silveira, T.E. Fingerlin et al. // *The American Association of Immunologists, Inc.* – 2007. – Vol. 179. – P. 4255 -4262.
283. The chemotherapeutic agent DMXAA potently and specifically activates the TBK1-IRF-3 signaling axis / Z.J. Roberts, N. Goutagny, P.Y. Perera et al. // *J Exp Med.* – 2007. – Vol. 204, №7. – P. 1559-1569.
284. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases / N. Roy, Q.L. Deveraux, R. Takahashi et al. // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 16, №7. – P. 6914-6925.
285. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor / S. Gasser, S. Orsulic, E. J. Brown, D. H. Raulet // *Nature.* – 2005. – Vol. 436, №7054. – P. 1186–1190.
286. The future perspectives of breast cancer therapy / L.W. Chow, C.C. Yiu, A.Y. Yip, W.T. Loo // *Biomed. Pharmacother.* – 2006. – Vol. 60(6). – P. 259-262.

287. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy / L. Apetoh, F. Ghiringhelli, A. Tesniere et al. // *Immunol Rev.* – 2007. – Vol. 220, Issue 1. – P. 47-59.
288. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease / D.A. Papanicolaou, R.L. Wilder, S.C. Manolagas, G.P. Chrousos // *Ann Intern Med.* – 1998. – Vol. 128, №2. – P. 127-137.
289. The prognostic value of four interleukin-1 gene polymorphisms in Caucasian women with breast cancer: a multicenter study / C. Grimm, E. Kantelhardt, G. Heinze et al // *BMC Cancer.* – 2009. - Vol. 6, № 9. – P.78.
290. The role of MyD88 and TLR4 in the LPSmimetic activity of Taxol / C.A. Byrd-Leifer, E.F. Block, K. Takeda et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2001. – Vol. 31, №8. – P. 2448–2457.
291. The ultimate goal of curative anti-cancer therapies: inducing an adaptive anti-tumor immune response / W.H. Fridman, J.L. Teillaud, C. Sautes-Fridman et al. // *Front. Immunol.* – 2011. –Vol. 2, №66.
292. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009 / A. Goldhirsch, J. N. Ingle, R. D. Gelber et al // *Ann Oncol.* – 2009. - Vol. 20, № 8. – P. 1319-1329.
293. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients / T.W. Huizinga, R.G. Westendorp, E.L. Bollen et al. // *J Neuroimmunol.* – 1997. – Vol. 72, №2. – P. 149-153.
294. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy / L. Apetoh, F. Ghiringhelli, A. Tesniere et al. // *Nat Med.* – 2007. – Vol. 13, № 9. – P. 1050-1059.
295. Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model / P. Costelli, N. Carbó, L. Tessitore et al. // *J. Clin. Invest.* – 1993. – Vol. 92, № 6 – P. 2783-2789.

296. Tumor necrosis factor- $\alpha$  -863 C/A promoter polymorphism affects the inflammatory response after cardiac surgery / J. Boehm, K. Hauner, J. Grammer et al. // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2011. – Vol. 40, №1. – P. 50-54.
297. Tumour necrosis factor- $\alpha$  promoter region polymorphisms affect the course of spontaneous HBsAg clearance./ P.C.Kao, J.F. Wu, Y.H. Ni et al // *Liver Int.*- 2010. – Vol. 30, №10. – P. 1448-1453.
298. Turk, J.L. Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms / J.L. Turk, D. Parker // *Immunol. Rev.* – 1982. – Vol. 65. – P. 99–113.
299. Unexpected association between induction of immunity to the universal tumor antigen CYP1B1 and response to next therapy / J.G. Gribben, D.P. Ryan, R. Boyajian et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11. – P. 4430–4436.
300. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer / M.I. Koukourakis, D. Papazoglou, A. Giatromanolaki et al. // *Lung Cancer.* – 2004. – Vol. 46, №3. – P. 293-298.
301. Wesche, J. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer / J. Wesche, K. Haglund, E.M. Haugsten // *Biochem J.* – 2011. – Vol. 437, №2. – P. 199-213.
302. Whiteside, T.L. The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors / T.L. Whiteside, H. Rabinowich // *Cancer Immunol. Immunother.* – 1998. – Vol. 46. – P. 175-184.
303. Wind, N.S. Multidrug Resistance in Breast Cancer: From In Vitro Models to Clinical Studies / N.S. Wind, I. Holen // *International Journal of Breast Cancer.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 1-12.
304. Wortzel, R.D. Multiple tumour-specific antigens expressed on a single tumour cell / R.D. Wortzel, C. Philipps, H. Schreiber // *Nature.* – 1983. – Vol. 304. – P. 165-167.

305. Zavazava, N. Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes / N. Zavazava, M. Krönke // *Nat. Med.* – 1996. – Vol. 2, №9. – P. 1005-1010.
306. Zhang, X. Hoechst 33342-Induced Apoptosis is Associated with Decreased Immunoreactive Topoisomerase I and Topoisomerase I-DNA Complex Formation / X. Zhang, F. Kiechle // *Annals of Clinical & Laboratory Science.* - 2001. - Vol. 31, №2 – P. 187-198.
307. Zitvogel, L. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion / L. Zitvogel, A. Tesniere, G. Kroemer // *Nature Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6, №10. – P. 715-727.