

# ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ХИМИОТЕРАПИИ

**Черткова А.И., Славина Е.Г., Шоуа Э.К., Жукова Л.Г.,  
Окружнова М.А., Нуртдинова В.А., Борунова А.А., Джгамадзе Н.Т.,  
Кадагидзе З.Г.**

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

**Резюме.** Химиотерапия является одним из основных методов лечения распространенных форм рака молочной железы. Установлено, что клиническая эффективность различных химиопрепаратов во многих случаях зависит не только от их прямого цитостатического и/или цитотоксического действия на опухолевые клетки, но и от их способности модулировать фенотип опухолевых клеток и воздействовать на противоопухолевый иммунный ответ. При этом решающее значение имеет исходное состояние иммунной системы организма и ее реакция на проводимое лечение. В ответе на опухоль участвуют клетки врожденного и адаптивного иммунитета (NK-, NKT-, Т-клетки). Эти популяции являются гетерогенными и содержат в своем составе как клетки с противоопухолевой активностью, так и регуляторные (супрессорные) клетки, подавляющие иммунный ответ и способствующие опухолевой прогрессии. Целью настоящей работы явилось определение связи исходного состояния клеточного иммунитета больных с местно-распространенным раком молочной железы с тройным негативным фенотипом и клиническим эффектом химиотерапии (цисплатин + доксорубицин/паклитаксел), а также изучение влияния проведенного лечения на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови пациенток. Отмечался момент наступления прогрессирования заболевания, определялись общая выживаемость и выживаемость без прогрессирования. У 25 из 53 (47,2%) включенных в исследование пациенток в течение периода наблюдения (35,5 месяцев) заболевание прогрессировало. У 28 из 53 (52,8%) прогрессирования заболевания не наблюдалось. Иммунологическое обследование пациенток включало иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови и определение цитотоксической активности NK-клеток до и после химиотерапии. Определяли процентное содержание эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов. Полученные результаты показали, что до начала лечения отмечались различия в отклонениях процентного содержания клеток некоторых популяций лимфоцитов от контроля между группами без прогрессирования и с прогрессированием заболевания. Наиболее значительные различия касались NKT-клеток и лимфоцитов, экспрессирующих активационный маркер CD25. Снижение количества NKT-клеток и акти-

## Адрес для переписки:

Кадагидзе Заира Григорьевна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ  
115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.  
Тел.: 8 (495) 324-94-74.  
E-mail: kad-zaira@yandex.ru

## Address for correspondence:

Kadagidze Zaira G.  
N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,  
115478, Russian Federation, Moscow,  
Kashirskoye highway, 24.  
Phone: 7 (495) 324-94-74.  
E-mail: kad-zaira@yandex.ru

## Образец цитирования:

А.И. Черткова, Е.Г. Славина, Э.К. Шоуа, Л.Г. Жукова, М.А. Окружнова, В.А. Нуртдинова, А.А. Борунова, Н.Т. Джгамадзе, З.Г. Кадагидзе «Основные параметры клеточного иммунитета у больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом: связь с эффективностью химиотерапии» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 667–680.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-667-680

© Черткова А.И. и соавт., 2018

## For citation:

A.I. Chertkova, E.G. Slavina, E.K. Shoua, L.G. Zhukova, M.A. Okruzhnova, V.A. Nurtidinova, A.A. Borunova, N.T. Dzhgamadze, Z.G. Kadagidze “The main parameters of cellular immunity in patients with triple-negative breast cancer: relationship with efficiency of chemotherapy”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 667–680. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-667-680  
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-667-680

виروанных CD25<sup>+</sup> лимфоцитов до начала химиотерапии ассоциировалось с повышением вероятности прогрессирования заболевания. Снижение процента НКТ-клеток по отношению к контролю отмечалось у 56% больных в группе с прогрессированием заболевания (ПЗ) и только у 21,4% в группе без прогрессирования болезни (БПЗ). Отношение шансов (ОШ) = 4,6 (95% ДИ 1,4-15,4). Процент CD25<sup>+</sup> лимфоцитов был снижен у 68,2% пациенток с ПЗ и у 28,6% БПЗ. ОШ = 5,4 (95% ДИ 1,6-18,1). У 26 из 53 пациенток до лечения исследовалась взаимосвязь общей выживаемости (ОВ) с процентом перфоринсодержащих НК-, НКТ- и Т-клеток и плотностью экспрессии перфорина (MFI) в этих лимфоцитах. Обнаружена положительная статистически значимая корреляция ОВ с плотностью экспрессии перфорина в клетках всех трех изученных популяций. У эффективно леченных больных после химиотерапии наблюдалась нормализация измененных до лечения показателей и повышение количества Т-клеток.

*Ключевые слова:* рак молочной железы (РМЖ), химиотерапия, субпопуляции лимфоцитов периферической крови, прогрессирование заболевания, общая выживаемость, выживаемость без прогрессирования

## THE MAIN PARAMETERS OF CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER: RELATIONSHIP WITH EFFICIENCY OF CHEMOTHERAPY

Chertkova A.I., Slavina E.G., Shoua E.K., Zhukova L.G., Okruzhnova M.A., Nurtdinova V.A., Borunova A.A., Dzhgamadze N.T., Kadagidze Z.G.

*N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Chemotherapy is among the primary methods of treating advanced breast cancer. It was shown that clinical efficacy of various chemotherapeutic agents in many cases depends not only on their direct cytostatic and/or cytotoxic effect upon tumor cells, but also on their ability to modulate phenotype of the tumor cells and to influence anti-tumor immune response. Initial state of the immune system and its response to treatment is crucial. Antitumor response involves cells of innate and adaptive immunity (NK, NKT, T cells). These populations are heterogeneous and contain, e.g., cells with antitumor activity and regulatory (suppressor) cells that suppress immune response and promote tumor progression. The aim of this work was to determine the relationship between the initial state of cellular immunity of patients suffering from locally advanced breast cancer with triple negative phenotype, and clinical effect of chemotherapy (cisplatin + doxorubicin/paclitaxel), and studying effects of the therapy upon subpopulation profiles of peripheral blood lymphocytes in the patients. We registered the terms of the disease progression as well as overall survival and progression-free survival. The disease progressed in 25 of 53 cases (47.2%) whereas 28 of 53 patients (52.8%) remained progression-free. The observation period was 35.5 months. Laboratory examination of the patients included immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes and determination of NK cell cytotoxic activity before and after chemotherapy. Percentages of effectors and regulatory lymphocyte populations were determined. The results obtained showed that, for some lymphocyte subsets, the pre-treatment differences of cell percentage deviations from control were found between the progression-free groups and patients with progression of the disease. The differences in percentages of NKT cells and lymphocytes expressing CD25 activation marker proved to be most significant. Decreased number of NKT cells and activated CD25<sup>+</sup> lymphocytes prior to chemotherapy was associated with increased probability of disease progression. Reduced percentage of NKT cells against control was observed in 56% of patients from the progression group (PD), and only 21.4% in the group free of disease progression (DF). [OR = 4.6 (95% CI 1.4 to 15.4)]. Percentage of CD25<sup>+</sup> lymphocytes was decreased from 68.2% in the PD group, and 28.6% for DF patients [OR = 5.4 (95% CI 1.6-18.1)]. We studied relationships between the overall survival (OS) and percentage of perforin-containing NK, NKT, and T cells, and mean perforin fluorescence density (PFD) in these lymphocyte subsets in 26 of the 53 patients before treatment. A statistically significant positive correlation was revealed between OS and perforin PFD in all the three cell populations under study. Normalization of the parameters altered before treatment, and an increase of T cell numbers was observed in the disease-free patients.

*Keywords:* triple negative breast cancer, chemotherapy, peripheral lymphocyte subpopulations, disease progression, overall survival, progression-free survival

## Введение

Химиотерапия является одним из основных методов лечения распространенных форм рака молочной железы (РМЖ). Установлено, что клиническая эффективность различных химиопрепаратов во многих случаях зависит не только от их прямого цитостатического и/или цитотоксического действия на опухолевые клетки, но и от их способности модулировать фенотип опухолевых клеток и воздействовать на противоопухолевый иммунный ответ. Решающее значение при этом имеет исходное состояние иммунной системы организма и ее реакция на проводимое лечение [11, 14]. В ответе на опухоль участвуют клетки врожденного и адаптивного иммунитета (NK-, NKT-, Т-клетки). Эти популяции являются гетерогенными и содержат в своем составе как клетки с противоопухолевой активностью, так и регуляторные (супрессорные) клетки, подавляющие иммунный ответ и способствующие опухолевой прогрессии [2]. В настоящее время многочисленные клинические исследования направлены на определение прогностической значимости различных популяций иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих опухоль [6, 19, 26]. В то же время иммунофенотипирование клеток периферической крови также является высокоинформативным методом и может использоваться как для анализа исходного состояния иммунитета, так и для мониторинга иммунологических показателей у пациентов в процессе лечения и при прогрессировании заболевания [22].

**Целью настоящего исследования** явилось определение связи между состоянием клеточного звена иммунитета (эффекторными и регуляторными лимфоцитами периферической крови) больных трижды негативным РМЖ (ТН РМЖ) и эффективностью химиотерапии цисплатином в сочетании с доксорубицином или паклитаксолом. Задачи исследования включали:

1. Определение связи между исходным количеством эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов периферической крови и отдаленными результатами лечения: прогрессированием заболевания и общей выживаемостью.

2. Определение влияния проведенной химиотерапии на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови пациенток с ТН РМЖ.

Предпринятое в работе определение взаимосвязи между состоянием иммунной системы больных ТН РМЖ до и после лечения и эффективностью противоопухолевой терапии является актуальным и может послужить основой для установления прогностических и предиктив-

ных иммунологических маркеров и для определения целесообразности введения иммунотерапии в стандартную схему лечения больных местнораспространенным ТН РМЖ.

## Материалы и методы

### Характеристика больных

В исследование были включены пациентки с местно-распространенным ТН РМЖ ( $n = 53$ ) в возрасте от 21 до 69 лет (медиана 48,5 лет). Все пациентки после 4-6 курсов химиотерапии (паклитаксел 80 мг/м<sup>2</sup> 1, 8, 15 дни + цисплатин 75 мг/м<sup>2</sup>, 1 день, цикл 28 дней или доксорубицин 50 мг/м<sup>2</sup> + цисплатин 60-75 мг/м<sup>2</sup>, 1 день, цикл 21 день) подвергались оперативному лечению. Период наблюдения составил 35,5 месяцев.

### Иммунологическое обследование

Иммунологическое обследование включало иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови (ПК) и определение цитотоксической активности NK-клеток больных ТН-РМЖ до и после химиотерапии (х/т). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом многопараметрового цитометрического анализа с использованием панели моноклональных антител, конъюгированных с FITC, PE, PC5, направленных против поверхностных и внутриклеточных маркеров лимфоцитов (BD Biosciences Becton Coulter, США; «Сорбент», Россия и eBioscience, США). Проточно-цитофлуориметрический анализ проводили на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur производства компании Becton Dickinson (США). Лимфоциты выделяли по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Определяли процентное содержание следующих популяций лимфоцитов: Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>), активированных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>), естественных киллерных Т-клеток (NKT – CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), естественных киллеров (NK – CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), В-клеток, а также регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток (Treg). Оценивалось количество перфорин-содержащих NKT (CD3<sup>+</sup>CD16/56<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup>), NK (CD3<sup>-</sup>CD16/56<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup>) и Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD16/CD56<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup>) и плотность экспрессии перфорина в этих популяциях (средняя интенсивность флуоресценции – Mean fluorescence intensity-MFI). Определялась цитотоксическая активность (ЦТА) естественных киллеров (NK-клеток) с помощью МТТ-теста в отношении клеток К-562 [18]. Контролем (К) служили практически здоровые женщины ( $n = 26$ ). Все паци-

ентки дали информированное согласие на проведение иммунологического обследования.

#### Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладных статистических пакетов Statistica и SPSS. Характер распределения показателей определяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова (при  $n \geq 50$ ) или критерия Шапиро–Уилка (при  $n < 50$ ). В случае нормального распределения показателей результаты представлены в виде среднего значения и 95% доверительного интервала для среднего значения:  $\bar{x}$  (95% ДИ). При распределении показателей, отличном от нормального — в виде Ме (95% ДИ). Для определения 95% ДИ для Ме использовалась «Таблица рангов ДИ для медианы» [4]. В случае нормального распределения показателей в сравниваемых группах статистическую значимость различий средних значений оценивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента (St) и 95% ДИ для разности средних значений. Если одна из сравниваемых групп имела распределение показателей, отличное от нормального, использовали непараметрический двусторонний U-критерий Манна–Уитни (U). В этом случае показатели в сравниваемых группах представлены в виде Ме (95% ДИ). Для установления связи между показателями в зависимости от характера распределения данных проводили корреляционный анализ Пирсона (коэффициент корреляции  $r$ ) или Спирмена (коэффициент корреляции  $\rho$ ). Вычисляли коэффициент детерминации и долю вариабельности переменной отклика, объясняемую вариабельностью предикторной переменной ( $r^2 \times 100$ ). 95% ДИ для разности медиан и коэффициентов корреляции рассчитывали с помощью программы Excel в соответствии с рекомендациями Бююль А. и Цёфель П. [1]. Для анализа различия частот в группах использовали двусторонний точный критерий Фишера. Вычисляли отношение шансов (ОШ) и 95% ДИ ОШ [1]. Уровень статистической значимости был принят равным 0,05.

## Результаты

#### Определение связи между субпопуляционным составом лимфоцитов периферической крови пациенток с ТН РМЖ до лечения и эффективностью химиотерапии

В течение периода наблюдения (35,5 мес.) из 53 включенных в исследование пациенток прогрессирование заболевания (ПЗ) диагностировано у 25 (47,2%) (группа В — ПЗ), у 28 (52,8%) прогрессирования заболевания не наблюдалось (группа А — без прогрессирования заболевания — БПЗ). Медиана ОВ составила 20,0 месяцев. Медиана ВБП — 15,3 месяца. Наблюдалась

умеренная положительная корреляция между общей выживаемостью (ОВ) и выживаемостью без прогрессирования (ВБП) [ $\rho = 0,514$  (95% ДИ 0,277-0,692);  $p = 0,000$ ]. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов ПК до начала лечения показало, что у пациенток обеих групп отмечались статистически значимые отклонения процентного содержания некоторых популяций лимфоцитов по сравнению с контролем (табл. 1 и 2). У пациенток группы А (БПЗ) был повышен процент активированных  $CD3^+HLA-DR^+$ Т-клеток и  $CD3^+CD16^+CD56^+NKT$ -клеток. Количество NKT-клеток в группе А было статистически значимо выше и по сравнению с группой В (ПЗ): разность между средними 4,3% (95% ДИ 1,1-7,2%),  $p = 0,009$  (St). В группе А и в группе В отмечалось снижение процента  $CD8^+CD28^+$ Т-лимфоцитов. У пациенток группы В отмечался также сниженный по сравнению с контролем процент активированных  $CD25^+$  и  $CD4^+CD25^+$ Т-клеток. Процент  $CD25^+$  лимфоцитов был снижен и по сравнению с группой А: разность между медианами 3,2% (95% ДИ 0,6-5,7%),  $p = 0,012$  (U). Процент регуляторных  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Т-клеток также был несколько ниже в группе с ПЗ, чем в группе БПЗ: разность между медианами 0,4% (95% ДИ 0,0-0,9%),  $p = 0,040$  (U). В то же время количество этих клеток в обеих группах не отличалось от контроля. Наиболее существенные различия между группами БПЗ и с ПЗ касались NKT-клеток и активированных  $CD25^+$  лимфоцитов (табл. 1 и 2). Изучение процентного содержания NKT-клеток индивидуально у каждой пациентки в обеих группах выявило снижение этого показателя по отношению к контролю у 14 из 25 (56%) больных в группе с ПЗ и только у 6 из 28 (21,4%) в группе БПЗ. Различие частот в группах было статистически значимо ( $p = 0,012$ ). Отношение шансов (ОШ) = 4,6 (95% ДИ 1,4-15,4). Процент  $CD25^+$  лимфоцитов определяли у 50 пациенток. Он был снижен у 15 из 22 (68,2%) пациенток с ПЗ и у 8 из 28 (28,6%) БПЗ. Р для различия частот = 0,000. ОШ = 5,4 (95% ДИ 1,6-18,1).

Корреляционный анализ Спирмена выявил сильную обратную корреляцию между процентом NK-клеток и процентом  $CD3^+$  Т-лимфоцитов ( $\rho = -0,757$  (95% ДИ от -0,855 до -0,608);  $p = 0,000$ ;  $r^2 \times 100 = 57,3\%$ ) и умеренную обратную корреляцию с процентом  $CD3^+CD4^+$ Т-клеток [ $\rho = -0,557$  (95% ДИ от -0,722 до -0,332);  $p = 0,000$ ;  $r^2 \times 100 = 31,03\%$ ]. Отмечалась также сильная прямая корреляция процента  $CD3^+CD16^+CD56^+NK$ -клеток и  $CD3^+CD8^+$  лимфоцитов ( $\rho = 0,766$  (95% ДИ от 0,621 до 0,860);  $p = 0,000$ ;  $r^2 \times 100 = 58,7\%$ ). Была обнаружена также слабая статистически значимая корреляция количества  $CD38^+$  лим-

**ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДО ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТН РМЖ БЕЗ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

TABLE 1. PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE POPULATIONS BEFORE TREATMENT IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS WITHOUT DISEASE PROGRESSION

Маркеры лимфоцитов Lymphocyte markers	БПЗ Disease-free patients (n = 28)	Контроль Controls (n = 26)	95% ДИ для разности медиан или средних значений*	p
	Me (95% ДИ) или $\bar{x}$ (95% ДИ)* Me (95% CI) or $\bar{x}$ (95% CI)*		95% CI for difference between medians or means*	
	%			
CD3 <sup>+</sup>	76,3 (71,5-78,7)	76,4 (69,8-78,1)	-3,0 – 4,8	0,687 U
CD4 <sup>+</sup>	45,6 (42,2-49,2)*	44,3 (40,0-48,5)*	-4,2 – 6,7*	0,637 st
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	45,2 (41,6-48,8)*	43,9 (39,6-48,2)*	-4,2 – 6,7*	0,640 st
CD8 <sup>+</sup>	26,9 (23,8-33,4)	23,0 (19,8-34,9)	-4,5 – 6,5	0,542 U
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	20,7 (14,4-26,8)	19,1 (14,4-21,1)	-4,7 – 5,9	0,811 U
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	5,6 (3,6-8,4)	5,4 (3,4-7,3)	-1,8 – 2,7	0,640 U
CD4/CD8	1,8 (1,3-1,9)	1,9 (1,3-2,6)	-0,6 – 0,4	0,738 U
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	9,0 (7,1-11,9)	5,9 (4,5-7,8)	0,6 – 5,4	0,013 U
CD3 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	12,5 (7,7-17,3)	9,7 (4,4-15,7)	-4,4 – 5,6	0,508 U
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	13,4 (11,4-17,7)	8,8 (6,0-10,8)	1,6 – 7,6	0,005 U
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	14,4 (108-18,3)	13,6 (10,0-21,6)	-4,3 – 4,6	0,993 U
CD19 <sup>+</sup>	6,5 (5,5-9,3)	4,8 (3,4-11,8)	-2,3 – 3,2	0,424 U
CD95	58,4 (53,0-63,9)*	49,8 (43,7-56,0)*	0,6 – 16,6*	0,036 st
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	8,0 (5,9-10,2)	9,9 (8,1-13,5)	-5,3 – -0,1	0,043 U
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	15,1 (12,6-20,9)	14,4 (7,6-19,9)	-2,3 – 3,2	0,577 U
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,53 (0,36-0,64)	0,71 (0,36-1,37)	-0,6 – 0,0	0,135 U
CD25 <sup>+</sup>	9,3 (7,7-12,1)	10,7 (7,7-13,5)	-4,7 – 1,3	0,272 U
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	7,0 (5,9-7,9)	8,8 (6,4-11,1)	-4,3 – 0,2	0,070 U
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	0,84 (0,37-1,42)	0,38 (0,24-1,0)	-0,1 – 0,9	0,112 U
Цитотоксическая активность НК-клеток Cytotoxic activity of NK cells	42,6 (27,6-54,9)	37,5 (31,6-51,5)	-10,0 – 13,2	0,772 U

Примечание. \* –  $\bar{x}$  (95% ДИ); \*\* – 95% ДИ для разности средних значений.

Note. \*,  $\bar{x}$  (95% CI); \*\*, 95% CI for difference between means.

**ТАБЛИЦА 2. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДО ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТН РМЖ С ПРОГРЕССИРОВАНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

TABLE 2. PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE POPULATIONS IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS WITH DISEASE PROGRESSION BEFORE TREATMENT

Маркеры лимфоцитов Lymphocytes markers	ПЗ Patients with disease progression (n = 25)	Контроль Controls (n = 26)	95% ДИ для разности медиан или средних значений* 95% CI for Difference between medians or means*	P
	Me (95% ДИ) или $\bar{x}$ (95% ДИ)* Me (95% CI) or $\bar{x}$ (95% CI)*			
	%			
CD3 <sup>+</sup>	74,4 (70,5-78,3)*	74,6 (72,2-77,1)*	-4,76 – 4,2*	0,905 st
CD4 <sup>+</sup>	44,7 (39,8-49,6)*	44,3 (40,0-48,5)*	-5,8 – 6,8*	0,877 st
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	44,3 (39,3-49,2)*	43,9 (39,6-48,2)*	-6,0 – 6,7*	0,911 st
CD8 <sup>+</sup>	22,9 (20,1-30,5)	23,0 (19,8-34,9)	-7,2 – 5,9	0,702 U
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	18,5 (13,2-25,1)	19,1 (14,4-21,1)	-5,5 – 5,9	0,893 U
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	4,5 (2,1-6,9)	5,4 (3,4-7,3)	-2,7 – 1,1	0,397 U
CD4/CD8	2,0 (1,2-2,4)	1,9 (1,3-2,6)	-0,6 – 0,57	0,939 U
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	8,2 (6,5-9,8)*	6,4 (5,3-7,5)*	-0,10 – 3,7*	0,065 st
CD3 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	9,6 (6,5-12,6)	9,7 (4,4-15,7)	-5,6 – 5,1	0,889 U
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	8,5 (6,0-11,7)	8,8 (6,0-10,8)	-3,0 – 2,8	0,948 U
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	12,1 (7,3-17,8)	13,6 (10,0-21,6)	-6,0 – 2,2	0,384 U
CD19 <sup>+</sup>	6,5 (3,2-9,4)	4,8 (3,4-11,8)	-2,7 – 3,0	0,918 U
CD95	57,3 (50,4-64,2)*	49,8 (43,7-56,0)*	-1,5 – 16,5*	0,102 st
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	7,2 (5,5-9,8)	9,9 (8,1-13,5)	-5,7 – -0,5	0,029 U
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	12,6 (10,0-15,6)	14,4 (7,6-19,9)	-5,3 – 4,5	0,889 U
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,47 (0,32-1,22)	0,71 (0,36-1,37)	-0,51 – 0,12	0,265 U
CD25 <sup>+</sup>	6,2 (4,7-7,7)*	11,3 (9,3-13,3)*	-7,5 – -2,7*	0,000 st
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	5,0 (3,7-6,4)*	9,2 (7,5-10,8*	-6,2 – -2,1*	0,000 st
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	0,38 (0,13-0,76)	0,38 (0,24-1,0)	-0,26 – 0,21	0,569 U
Цитотоксическая активность НК-клеток Cytotoxic activity of NK cells	44,1 (33,3-54,8)*	40,8 (33,5-48,2)*	-9,5 – 15,9*	0,608 st

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

**ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ОБЩЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ И ВЫЖИВАЕМОСТИ БЕЗ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ С ОСНОВНЫМИ ЭФФЕКТОРНЫМИ И РЕГУЛЯТОРНЫМИ ПОПУЛЯЦИЯМИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С ТН РМЖ, А ТАКЖЕ СОДЕРЖАНИЕМ ПЕРФОРИНА В КЛЕТКАХ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ НК-КЛЕТОК**

TABLE 3. CORRELATION BETWEEN OVERALL SURVIVAL AND PROGRESSION-FREE SURVIVAL, AND MAJOR EFFECTOR AND REGULATORY POPULATIONS OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER, AS WELL AS PERFORIN CONTENT IN THE CELLS, AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF NK CELLS

Показатель до лечения Parameter before treatment	n	Общая выживаемость Overall survival				Выживаемость без прогрессирования Disease-free survival			
		r/ρ*	95% ДИ 95% CI	r <sup>2</sup> × 100 (%)	p	ρ*	95% ДИ 95% CI	r <sup>2</sup> × 100 (%)	p
Положительная корреляция Positive correlation									
CD4 <sup>+</sup> , %	53	0,278	0,008 – 0,510	7,73	0,044	0,294	0,026 – 0,523	8,64	0,032
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	53	0,276	0,006 – 0,503	7,62	0,045	0,284	0,015 – 0,515	8,07	0,040
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> , %	53					0,279	0,009 – 0,511	7,78	0,043
Цитотоксическая активность НК-клеток, % Cytotoxic activity of NK cells, %	35	0,364	0,035 – 0,622	13,2	0,032				
Плотность экспрессии перфорина (MFI) в НК-клетках Mean fluorescence intensity (MFI) of perforin in NK cells	26	0,458	0,086 – 0,718	20,9	0,019				
Плотность экспрессии перфорина (MFI) в НКТ-клетках Mean fluorescence intensity (MFI) of perforin in NKT cells	26	0,601	0,278 – 0,802	36,1	0,001				
Плотность экспрессии перфорина (MFI) в CD3 <sup>+</sup> Т-клетках Mean fluorescence intensity (MFI) of perforin in CD3 <sup>+</sup> T cell subset	26	0,540	0,193 – 0,767	29,2	0,004				
Отрицательная корреляция Negative correlation									
CD3 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> , %	53	-0,456	-0,653 – -0,223	20,8	0,001				
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> , %	53	-0,404	-0,608 – -0,150	16,3	0,003				

Таблица 3 (окончание)  
Table 3 (continued)

Показатель до лечения Parameter before treatment	n	Общая выживаемость Overall survival				Выживаемость без прогрессирования Disease-free survival			
		r/ρ*	95% ДИ 95% CI	r <sup>2</sup> × 100 (%)	p	ρ*	95% ДИ 95% CI	r <sup>2</sup> × 100 (%)	p
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> , %	50	-0,395	-0,616 – -0,131	15,6	0,005				
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> , %	53	-0,278	-0,510 до 0,008	7,73	0,044				
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	53	-0,536	-0,704 – -0,311	28,7	0,000	-0,272	-0,505 – -0,002	7,4	0,048

Примечание. \* r – коэффициент корреляции Пирсона, ρ – коэффициент корреляции Спирмена.

Note. \* r, Pearson correlation quotient; ρ, Spearman correlation quotient.

ТАБЛИЦА 4. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТН РМЖ БЕЗ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 4. PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBSETS FREE TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS AFTER TREATMENT

Маркеры лимфоцитов Lymphocyte markers	БПЗ Disease free patients (n = 17)	Контроль Controls (n = 26)	95% ДИ для разности медиан или средних значений*	p
	Me (95% ДИ) или $\bar{x}$ (95% ДИ)* Me (95% CI) or $\bar{x}$ (95% CI)*		95% CI for difference between medians or means*	
	%			
CD3 <sup>+</sup>	82,3 (79,5-85,2)	76,4 (69,8-78,1)	2,3 – 10,3	0,006 U
CD4 <sup>+</sup>	51,4 (46,8-56,1)*	44,3 (40,0-48,5)*	0,9 – 13,5*	0,026 st
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	50,6 (45,6-55,6)*	43,9 (39,6-48,2)*	0,24 – 13,1*	0,042 st
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	6,5 (4,7-8,2)*	6,4 (5,3-7,5)*	-1,8 – 2,0*	0,936 st
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	8,6 (6,7-14,7)	8,8 (6,0-10,8)	-2,6 – 4,6	0,722 U
CD19 <sup>+</sup>	3,3 (1,9-5,0)	4,8 (3,4-11,8)	-6,8 – -0,2	0,022 U
CD95	55,1 (45,3-65,0)*	49,8 (43,7-56,0)*	-5,3 – 15,9*	0,320 st
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	10,8 (6,7-12,7)	9,9 (8,1-13,5)	-4,3 – -2,3	0,632 U
CD25 <sup>+</sup>	11,1 (8,5-13,8)*	11,3 (9,3-13,3)*	-3,3 – 3,0	0,934 st
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	9,1 (6,9-11,3)*	9,2 (7,5-10,8)*	-2,6 – 2,5	0,969 st

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

**ТАБЛИЦА 5. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТН РМЖ С ПРОГРЕССИРОВАНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

TABLE 5. PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE POPULATIONS IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS WITH DISEASE PROGRESSION AFTER TREATMENT

Маркеры лимфоцитов Lymphocyte markers	ПЗ Patients with disease progression (n = 14)	Контроль Controls (n = 26)	95% ДИ для разности медиан или средних значений* 95% CI for difference between medians or means*	p
	Ме (95% ДИ) или $\bar{x}$ (95% ДИ)* Me (95% CI) or $\bar{x}$ (95% CI)*			
	%			
CD3 <sup>+</sup>	83,8 (59,2-88,9)	76,4 (69,8-78,1)	-1,2 – 12,5	0,063 U
CD4 <sup>+</sup>	47,8 (41,4-54,0) *	44,3 (40,0-48,5)*	-3,7 – 10,6	0,329 st
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	47,4 (41,0-53,8)*	43,9 (39,6-48,2)*	-3,7 – 10,7	0,336 st
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	8,8 (6,2-11,4)*	6,4 (5,3-7,5)*	-0,32 – 5,2	0,080 st
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	7,4 (5,8-17,0)	8,8 (6,0-10,8)	-3,0 – 2,5	0,922 U
CD19 <sup>+</sup>	4,3 (3,0-9,0)	4,8 (3,4-11,8)	-6,4 – 1,7	0,566 U
CD95	52,7 (42,4-63,0)*	49,8 (43,7-56,0)*	-8,0 – 13,7	0,595 st
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	6,9 (4,3-10,8)	9,9 (8,1-13,5)	-6,4 – -0,6	0,014 U
CD25 <sup>+</sup>	7,8 (5,2-10,5)*	11,3 (9,3-13,3)*	-6,6 – -0,26	0,035 st
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	6,6 (4,3-8,9)*	9,2 (7,5-10,8)*	-5,2 – 0,035	0,053 st

**Примечание. См. примечание к таблице 1.**

Note. As for Table 1.

фоцитов с CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> регуляторными Т-клетками [ $p = 0,480$  (95% ДИ от 0,233 до 0,669);  $p = 0,000$ ;  $r^2 \times 100 = 23,0\%$ ].

Определение значения исходного уровня изученных иммунологических показателей для ОВ пациенток с ТН РМЖ выявило умеренную статистически значимую отрицательную корреляцию между ОВ и исходным процентом CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>Т-клеток и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>НК-клеток, а также процентом регуляторных CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> популяций лимфоцитов (табл. 3). У 26 из 53 пациенток проанализирована взаимосвязь ОВ с процентом перфоринсодержащих НК-, НКТ- и Т-клеток и плотностью экспрессии перфорина (MFI) в этих лимфоцитах. Обнаружена положительная статистически значимая корреляция ОВ с плотностью экспрессии перфорина в клетках всех трех изученных популяций. Результаты представлены в таблице 3. Различий в процентном содержании пер-

форин-позитивных клеток в составе НК-, НКТ- и Т-лимфоцитов между группами больных БПЗ, с ПЗ и контролем обнаружено не было. Статистически значимой корреляции ОВ и ВБП с этими показателями также не наблюдалось (данные не представлены). Цитотоксическая активность НК-клеток в обеих группах не отличалась от контроля (табл. 1 и 2).

#### **Влияние химиотерапии на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных ТН РМЖ**

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов ПК после химиотерапевтического лечения проводилось у 31 пациентки (17 пациенток БПЗ – группа С и 14 с ПЗ – группа D). Несмотря на меньшее число пациенток, включенных в эту часть исследования, полученные результаты показали, что в группах С и D до лечения отмечались статистически значимые отклонения от контроля процентного содержания клеток

практически тех же популяций, что и в группах А и В. До лечения у пациенток в группе С (БПЗ,  $n = 17$ ), как и в группе А ( $n = 29$ ), было повышено количество НКТ-клеток как по сравнению с контролем, так и по сравнению с группой D [Ме (95% ДИ) гр. С: 13,2% (11,3-18,2%); К: 8,8% (6,0-10,8%);  $p_{с,к} = 0,033$ ; гр. D: 6,8% (3,6-16,9%);  $p_{с,д} = 0,040$ ], и снижено количество  $CD8^+CD28^+$ -клеток [Ме (95% ДИ); гр. С: 7,6% (5,2-9,7%), К: 9,9% (8,1-13,5%);  $p = 0,014$ ]. У больных группы D (с ПЗ;  $n = 14$ ), как и в группе В ( $n = 25$ ), наблюдалось снижение процента  $CD8^+CD28^+$ -клеток [Ме (95% ДИ) гр. D: 7,3% (4,3-10,8%); К: 9,9% (8,1-13,5%);  $p = 0,048$ ] и активированных  $CD25^+$  [x̄ (95% ДИ) гр. D: 5,7% (3,7-7,8%), К: 11,3% (9,3-13,3%);  $p = 0,000$ ] и  $CD4^+CD25^+$  лимфоцитов [x̄ (95% ДИ) гр. D: 4,8% (2,9-6,7%), К: 9,2% (7,5-10,8%);  $p = 0,001$ ]. После проведенной химиотерапии у пациенток БПЗ (гр. С) статистически значимо повысилось количество  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  и  $CD3^+CD4^+$ -клеток по сравнению с контролем. Наблюдалась также нормализация процентного содержания НКТ- и  $CD8^+CD28^+$ -лимфоцитов: количество НКТ-клеток снизилось, а  $CD8^+CD28^+$ -лимфоцитов повысилось до контрольного уровня. Снизилось также количество В-клеток (табл. 4). У больных в группе с ПЗ (гр. D) после лечения процент  $CD4^+CD25^+$ -клеток повысился до нормы, в то же время количество активированных  $CD25^+$  лимфоцитов и  $CD8^+CD28^+$ -клеток и после лечения было статистически значимо ниже, чем в контроле (табл. 5). Количество клеток всех остальных определявшихся в работе популяций не отличалось от контроля ни до, ни после лечения.

## Обсуждение

Проведенные исследования показали, что у включенных в исследование больных местно-распространенным ТН РМЖ еще до начала лечения наблюдались статистически значимые отклонения процентного содержания некоторых популяций лимфоцитов от контроля. При этом они в основном были различны у пациенток БПЗ и с ПЗ. Наиболее значительные различия касались НКТ-клеток и активированных  $CD25^+$  лимфоцитов, процент которых был статистически значимо выше у больных БПЗ, чем в контрольной группе и чем у пациенток с ПЗ. Снижение количества НКТ-клеток до лечения имело неблагоприятное прогностическое значение: у пациенток со сниженным до лечения процентом НКТ-клеток вероятность прогрессирования заболевания оказалась в 4,6 выше (95% ДИ 1,4-15,4), чем у больных с повышенным или нормальным количеством этих лимфоцитов. Наблюдалась также слабая положительная корреляция

количества НКТ-клеток с ВБП:  $\rho = 0,279$  (95% ДИ 0,009-0,511);  $p = 0,043$  и средняя положительная корреляция плотности экспрессии перфорина в этих лимфоцитах с ОВ:  $\rho = 0,601$  (95% ДИ 0,278-0,802);  $p = 0,001$ ; ( $r^2 \times 100 = 36,1\%$ ). Таким образом, благоприятным фактором являлось не только повышение количества НКТ-клеток ПК до лечения, но и уровень экспрессии перфорина в каждой НКТ-клетке. После химиотерапии количество НКТ-клеток у пациенток БПЗ снизилось до контрольных значений.

В настоящее время определяют два основных типа НКТ-клеток: НКТ-клетки I типа и НКТ-клетки II типа. Оба типа НКТ-клеток играют важную регуляторную роль при аутоиммунных заболеваниях, воспалении и опухолевом росте и могут оказывать как стимулирующее, так и ингибиторное влияние на эти процессы [27]. Согласно современным представлениям о функционировании НКТ-клеток, при злокачественных новообразованиях, НКТ-клетки I типа (iNKT — инвариантные) в большей степени проявляют противоопухолевую активность, а НКТ-клетки II типа участвуют в стимуляции опухолевого роста. [9, 27]. Наиболее хорошо изучены НКТ-клетки I типа. В клинических исследованиях было установлено, что исходное количество iNKT-клеток ПК при некоторых злокачественных опухолях может коррелировать с прогнозом заболевания. По данным Metelitsa и соавт. [16] и Schneiders и соавт. [23], повышение количества этих клеток в ПК до лечения имеет положительное значение для клинической эффективности противоопухолевой терапии и может ассоциироваться с увеличением общей выживаемости, по сравнению с больными с исходно низким уровнем показателя. В то же время снижение количества iNKT-клеток может иметь неблагоприятное прогностическое значение при некоторых формах рака [17]. В экспериментальных исследованиях и при некоторых опухолях человека было обнаружено, что НКТ-клетки II типа могут подавлять противоопухолевый иммунный ответ, используя различные механизмы, включающие взаимодействие с другими популяциями клеток-супрессоров [9].

В данной работе мы определяли популяцию НКТ-клеток по экспрессии основных, наиболее часто используемых при исследовании этих лимфоцитов, маркеров:  $CD3$ ,  $CD16$  и  $CD56$  ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ), которые не дают возможности установить их тип (I или II). Причины обнаруженного в настоящем исследовании повышения количества НКТ-клеток ПК и характер их функционирования у части пациенток с ТН РМЖ до лечения не ясны. Однако оно являлось благоприятным фактором: количество НКТ-клеток

было повышено главным образом у больных БПЗ. Ранее мы обнаружили у пациенток с первично операбельным раком молочной железы зависимость процента  $CD3^+CD16^+CD56^+NKT$ -клеток от стадии заболевания: у больных с 1 и 2 стадиями процент этих клеток был статистически значимо выше по сравнению с донорами и больными с 3 стадией [3]. В то же время обнаруженное в данном исследовании снижение этого показателя до лечения, имело неблагоприятное прогностическое значение.

В дополнительном исследовании было проведено определение значения исходного количества  $NKT$ -клеток для непосредственных результатов лечения, таких как степень лечебного патоморфоза опухоли (ЛПО). Мы не обнаружили статистически значимой корреляции процента  $NKT$ -клеток со степенью ЛПО:  $p = 0,111$  (95% ДИ от  $-0,182$  до  $0,386$ );  $p = 0,437$  и различий между группами с высокой (3-4) и низкой степенью ЛПО (1-2), а также с контролем: Ме (95% ДИ) 11,9% (9,1-14,3%); 10,4% (3,3-16,9%); 8,8% (6,0-10,8%);  $p = 0,584$ ; 0,156; 0,756 соответственно. Таким образом, количество  $CD3^+CD56^+CD16^+NKT$ -клеток ПК до начала лечения, по-видимому, имеет значение в большей степени для отдаленных результатов терапии.

У больных в группе БПЗ после химиотерапии увеличился процент  $CD3^+T$ -клеток, главным образом за счет увеличения  $CD4^+T$ -лимфоцитов. Количество  $CD3^+CD8^+T$ -клеток было в пределах контрольных значений у пациенток обеих групп и до, и после лечения. Отмечалась статистически значимая положительная корреляция исходного количества  $CD4^+T$ -клеток (слабая), а также плотности экспрессии перфорина в  $CD3^+CD16^+CD56^+T$ -клетках (средняя) с ОБ. Таким образом, уровень экспрессии перфорина в  $T$ -клетках (т.е. функциональный потенциал  $T$ -клеток) имел, по-видимому, большее значение, чем количество этих клеток в ПК (табл. 3).  $CD4^+T$ -клетки являются одной из важнейших популяций иммунокомпетентных клеток, участвующих в противоопухолевом иммунном ответе. По данным Trédan и соавт. [28] и Péron и соавт. [21], исходное количество  $CD4^+$  клеток в периферической крови может являться независимым прогностическим фактором при различных злокачественных опухолях. Они продемонстрировали, что снижение количества этих лимфоцитов коррелирует с прогрессивным течением заболевания и с уменьшением общей выживаемости больных метастатическим раком молочной железы, лимфомой, миеломой, саркомой и другими формами опухолей. Таким образом, обнаруженное нами повышение  $CD3^+CD4^+T$ -лимфоцитов в ПК больных ТН РМЖ после лечения, по-видимому, имеет по-

ложительное значение, что доказывается увеличением их числа только у пациенток БПЗ.

Исходное снижение количества активированных  $CD25^+$  лимфоцитов и  $CD4^+CD25^+T$ -клеток было обнаружено только у больных с ПЗ. Молекула  $CD25$ , являясь рецептором  $IL-2$ , играет ключевую роль в запуске пролиферативного ответа  $T$ -лимфоцитов. Снижение этого показателя может указывать на нарушение способности лимфоцитов (в частности,  $CD4^+CD25^+T$ -клеток) больных с ПЗ к пролиферации и дифференцировке [7, 10]. На отрицательное значение снижения исходного процента активированных  $CD25^+$  лимфоцитов у больных ТН РМЖ указывает и связанное с ним повышение вероятности прогрессирования заболевания в 5,4 раза по сравнению с больными, имеющими нормальные или повышенные значения показателя.

Важной эффекторной популяцией врожденного иммунитета являются естественные киллеры (НК-клетки). Известно, что они способны контролировать рост некоторых опухолей, а также могут регулировать функцию других иммунокомпетентных клеток: макрофагов, дендритных и эндотелиальных клеток,  $B$ - и  $T$ -лимфоцитов [8]. В данном исследовании была обнаружена сильная отрицательная корреляция количества  $CD3^+T$ -клеток с количеством НК-клеток до лечения, что может указывать на компенсаторное взаимоотношение двух основных линейных популяций ПК. Наблюдалась статистически значимая положительная корреляция ОБ с исходным уровнем перфорина в  $CD3^+CD16^+CD56^+NK$ -клетках. В то же время обнаруженная отрицательная ассоциация ОБ с исходным количеством  $CD3^+CD8^+$  лимфоцитов может указывать на то, что субпопуляция НК-клеток, экспрессирующих маркер  $CD8$ , может являться негативным фактором у больных местно-распространенным ТН РМЖ. Отрицательная корреляция ОБ с исходным процентом  $CD3^+CD16^+CD56^+NK$ -клеток может быть обусловлена  $CD3^+CD8^+NK$ -клетками. Отмечалась сильная прямая корреляция процента  $CD3^+CD16^+CD56^+NK$ -клеток (вся популяция естественных киллеров) и  $CD3^+CD8^+NK$ -клеток [ $p = 0,766$ ;  $r^2 \times 100 = 58,7\%$ ].

Была обнаружена также отрицательная ассоциация между ОБ и исходным количеством двух регуляторных популяций лимфоцитов:  $CD8^+CD28^+T$ -клеток и  $CD4^+CD25^+FoxP3^+Treg$ .  $CD8^+T$ -лимфоциты являются основной эффекторной популяцией адаптивного иммунитета и основными клетками-эффекторами противоопухолевого иммунитета. Однако, известно, что популяция  $CD3^+CD8^+T$ -клеток является гетерогенной и включает в свой состав не только клетки-эффекторы, но и регуляторные (супрессорные

клетки). Описаны различные фенотипические варианты супрессорных CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Наиболее часто их описывают как CD8<sup>+</sup>T-клетки, не экспрессирующие основной коактивационный рецептор CD28 (CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) [12]. Ряд авторов продемонстрировал, что у пациентов со злокачественными опухолями повышение количества этих клеток в периферической крови и в опухолевой ткани может коррелировать с плохим прогнозом заболевания [13, 24, 25]. Известно, что CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg могут играть при злокачественных опухолях двойную роль: участвовать как в стимуляции опухолевого роста, так и в его торможении. Однако в большинстве случаев повышение их количества в периферической крови и опухолевом микроокружении коррелирует с плохим прогнозом заболевания [29, 30]. Таким образом, в настоящем исследовании повышение количества клеток этих регуляторных популяций (CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T-клеток) до лечения имело неблагоприятное прогностическое значение у пациенток с местно-распространенным ТН РМЖ. В то же время при сравнении групп в зависимости от прогрессирования заболевания оказалось, что процент регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T-клеток до лечения был несколько выше у больных в группе БПЗ, чем в группе с ПЗ: разность между медианами 0,4% (95% ДИ 0,0-0,9%),  $p = 0,040$  U. Однако результаты, несмотря на статистическую значимость различия, следует оценивать как неоднозначные, так как нижняя граница 95% ДИ разности медиан равна нулю. К тому же количество этих клеток в обеих группах не отличалось от контроля. Отрицательная ассоциация ОВ с Т-лимфоцитами, экспрессирующими многофункциональную молекулу CD38<sup>+</sup>, может быть связана с высокой экспрессией CD38 на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клетках [5, 15, 20].

## Заключение

Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют предположить, что как эф-

фекторные, так и регуляторные популяции лимфоцитов в той или иной степени оказывают влияние (положительное или отрицательное) на эффективность химиотерапии цисплатином в сочетании с доксорубицином или паклитакселем у больных ТН-РМЖ. При этом большое значение для отдаленных результатов лечения (прогрессирование заболевания, общая выживаемость, выживаемость без прогрессирования) имеет исходное состояние иммунной системы пациенток. Полученные при корреляционном анализе коэффициенты детерминации для статистически значимых коэффициентов корреляции для каждой отдельной популяции были невысоки. Однако при иммунном ответе на опухоль иммунокомпетентные клетки действуют совместно, и каждая популяция лимфоцитов непосредственно сама или опосредованно через другие популяции клеток, в той или иной степени, вносит свой вклад в регуляцию опухолевого роста и эффективность лечения. Следует учесть, что наиболее значимые для прогноза заболевания популяции иммунокомпетентных клеток могут различаться в зависимости от нозологической формы рака, а также у индивидуальных пациентов даже в случае одного и того же варианта опухоли. Повидимому, в обеспечении непосредственных и отдаленных результатов лечения также могут участвовать различные популяции лимфоцитов. В связи с этим для определения прогностических и предиктивных факторов и для разработки индивидуальных подходов к лечению онкологических пациентов следует проводить комплексное изучение клеточного звена иммунитета в каждом конкретном случае. При этом необходимо исследовать одновременно достаточное число популяций иммунокомпетентных клеток (эффекторные и регуляторные популяции), так как прогностическое значение может иметь не одна определенная популяция, а их сочетание и соотношение.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы / References

1. Бюль А., Цёфель П. SPSS: Искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей. Пер. с нем. СПб.: ДиаСофтЮП, 2005. 608 с. [Bühl A., Zöfel P. SPSS Version 10. Einführung in die modern datenanalyse unter Windows. Addison-Wesley]. St. Petersburg: DiaSoftYUP, 2005. 608 p.
2. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И. Иммунная система и рак // Практическая онкология, 2016. Т. 17, № 2. С. 62-73. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I. Immunity and cancer. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*, 2016, Vol. 17, no. 2, pp. 62-73. (In Russ.)]
3. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А., Славина Е.Г. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественной меланомой и раком молочной железы // Иммунология, 2014. Т. 35, № 2. С. 64-67. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabolotina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A., Slavina E.G. The main subpopulation regulatory lymphocytes in patients with malignant melanoma and breast cancer. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 2, pp. 64-67. (In Russ.)].

4. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 217 с. [Petrie A., Sabin C. Medical statistics at a glance. John Wiley and Sons Limited]. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 217 p.
5. Bahri R., Bollinger A., Bollinger T., Orinska Z., Bulfone-Paus S. Ectonucleotidase CD38 demarcates regulatory, memory-like CD8(+) T cells with IFN-gamma-mediated suppressor activities. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 9, e45234. doi: 10.1371/journal.pone.0045234.
6. Balermipas P., Rödel F., Rödel C., Krause M., Linge A., Lohaus F., Baumann M., Tinhofer I., Budach V., Gkika E., Stuschke M., Avlar M., Grosu A.L., Abdollahi A., Debus J., Bayer C., Stangl S., Belka C., Pigorsch S., Multhoff G., Combs S.E., Mönnich D., Zips D., Fokas E. CD8<sup>+</sup> tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). *Int. J. Cancer*, 2016, Vol. 138, no. 1, pp. 171-181.
7. Benczik M., Gaffen S.L. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol. Invest.*, 2004, Vol. 33, no. 2, pp. 109-142.
8. Crouse J., Xu H.C., Lang P.A., Oxenius A. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 1, pp. 49-58.
9. Dhodapkar M.V., Kumar V. Type II NKT cells and their emerging role in health and disease. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 3, pp. 1015-1021.
10. Ellery J.M., Nicholls P.J. Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction. *Immunol. Cell Biol.*, 2002, Vol. 80, no. 4, pp. 351-357.
11. Emens L.A., Middleton G. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol. Res.*, 2015, Vol. 3, no. 5, pp. 436-443.
12. Filaci G., Fravega M., Negrini S., Procopio F., Fenoglio D., Rizzi M., Brenni S., Contini P., Olive D., Ghio M., Setti M., Accolla R.S., Puppo F., Indiveri F. Nonantigen specific CD8<sup>+</sup> T suppressor lymphocytes originate from CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum. Immunol.*, 2004, Vol. 65, no. 2, pp. 142-156.
13. Karagöz B., Bilgi O., Gümüş M., Erikçi A.A., Sayan O., Türken O., Kandemir E.G., Öztürk A., Yaylaci M. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients. *Med. Oncol.*, 2010, Vol. 27, no. 1, pp. 29-33.
14. Kepp O., Senovilla L., Kroemer G. Immunogenic cell death inducers as anticancer agents. *Oncotarget*, 2014, Vol. 5, no. 14, pp. 5190-5191.
15. Krejčík J., Casneuf T., Nijhof I.S., Verbist B., Bald J., Plesner T., Syed K., Liu K., van de Donk N.W., Weiss B.M., Ahmadi T., Lokhorst H.M., Mutis T., Sasser A.K. Daratumumab depletes CD38<sup>+</sup> immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*, 2016, Vol. 128, no. 3, pp. 384-394.
16. Metelitsa L.S., Wu H.-W., Wang H., Yang Y., Warsi Z., Asgharzadeh S., Groshen S., Wilson S.B., Seeger R.C. Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 199, no. 9, pp. 1213-1221.
17. Molling J.W., Langius J.A., Langendijk J.A., Leemans C.R., Bontkes H.J., van der Vliet H.J., von Blumberg B.M., Scheper R.J., van den Eertwegh A.J. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2007, Vol. 25, no. 7, pp. 862-868.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.*, 1983, Vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63.
19. Okabe M., Toh U., Iwakuma N., Saku S., Akashi M., Kimitsuki Y., Seki N., Kawahara A., Ogo E., Itoh K., Akagi Y. Predictive factors of the tumor immunological microenvironment for long-term follow-up in early stage breast cancer. *Cancer Sci.*, 2017, Vol. 108, no. 1, pp. 81-90.
20. Patton D.T., Wilson M.D., Rowan W.C., Soond D.R., Okkenhaug K. The PI3K p110delta regulates expression of CD38 on regulatory T cells. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 3, e17359. doi:10.1371/journal.pone.0017359.
21. Péron J., Cropet C., Tredan O., Bachelot T., Ray-Coquard I., Clapisson G., Chabaud S., Philip I., Borg C., Cassier P., Labidi Galy I., Sebban C., Perol D., Biron P., Caux C., Menetrier-Caux C., Blay J.Y. CD4 lymphopenia to identify end-of-life metastatic cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 2013, Vol. 49, no. 5, pp. 1080-1089.
22. Rühle P.F., Fietkau R., Gaipf U.S., Frey B. Development of a modular assay for detailed immunophenotyping of peripheral human whole blood samples by multicolor flow cytometry. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 8, pii: E1316. doi: 10.3390/ijms17081316.
23. Schneiders F.L., de Bruin R.C., van den Eertwegh A.J., Scheper R.J., Leemans C.R., Brakenhoff R.H., Langendijk J.A., Verheul H.M., de Gruijl T.D., Molling J.W., van der Vliet H.J. Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up. *J. Clin. Oncol.*, 2012, Vol. 30, no. 5, pp. 567-570.
24. Shen Y., Qu Q.X., Zhu Y.B., Zhang X.G. Analysis of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-suppressor cells in gastric cancer patients. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2012, Vol. 33, no. 2, pp. 149-155.
25. Song G., Wang X., Jia J., Yuan Y., Wan F., Zhou X., Yang H., Ren J., Gu J., Lysterly H.K. Elevated level of peripheral CD8(+)CD28(-) T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013, Vol. 62, no. 6, pp. 1123-1130.

26. Stanton S.E., Disis M.L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J. Immunother. Cancer*, 2016, Vol. 4, p. 59.
27. Terabe M., Berzofsky J.A. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv. Cancer Res.*, 2008, Vol. 101, pp. 277-348.
28. Trédan O., Manuel M., Clapisson G., Bachelot T., Chabaud S., Bardin-dit-Courageot C., Rigal C., Biota C., Bajard A., Pasqual N., Blay J.Y., Caux C., Ménétrier-Caux C. Patients with metastatic breast cancer leading to CD4<sup>+</sup> T cell lymphopaenia have poor outcome. *Eur. J. Cancer*, 2013, Vol. 49, no. 7, pp. 1673-1682.
29. Whiteside T.L. The role of regulatory T cells in cancer immunology. *Immunotargets Ther.*, 2015, Vol. 4, pp. 159-171.
30. Wolf D., Sopper S., Pircher A., Gastl G., Wolf A.M. Treg(s) in cancer: friends or foe? *J. Cell. Physiol.*, 2015, Vol. 230, no. 11, pp. 2598-2605.

**Авторы:**

**Черткова А.И.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Славина Е.Г.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Шоуа Э.К.** — врач, лаборатория клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Жукова Л.Г.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник отделения химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Окружнова М.А.** — к.м.н., младший научный сотрудник отделения хирургического № 13 торако-абдоминального отдела (клинических биотехнологий) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Нуртдинова В.А.** — биолог, лаборатория клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Борунова А.А.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Джгамадзе Н.Т.** — научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Кадагидзе З.Г.** — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Chertkova A.I.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Slavina E.G.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Shoua E.K.**, Physician, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Zhukova L.G.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Chemotherapy and Combined Cancer Treatment, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Okruzhnova M.A.**, PhD (Medicine), Junior Research Associate, Department of Clinical Biotechnology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Nurtdinova V.A.**, Biologist, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Borunova A.A.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Dzhgamadze N.T.**, Research Associate, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Kadagidze Z.G.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Поступила 09.10.2017  
Принята к печати 10.10.2017

Received 09.10.2017  
Accepted 10.10.2017