

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

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Томск – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт онкологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук,  
профессор

Кологривова Елена Николаевна

доктор биологических наук,  
профессор

Чердынцева Надежда Викторовна

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор, профессор кафедры  
биохимии и молекулярной  
биологии ГБОУ ВПО  
«Сибирский государственный  
медицинский университет»  
Минздрава России

Степовая Елена Алексеевна

доктор медицинских наук, профессор,  
зав. лабораторией биохимии опухолей  
ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН

Кондакова Ирина Викторовна

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г. в \_\_\_ ч. на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (634050, г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета



Петрова И.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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 [Хайленко В.А., 2005; Давыдов М.И., Летагин В.П., 2007; Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2009]. РМЖ является ведущей причиной смерти от злокачественных новообразований в женской популяции, на его долю приходится более четверти смертей женщин трудоспособного возраста от рака [Давыдов М.И., Летагин В.П., 2007; Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2009; Jemal A. et al., 2011; Чиссов В.И. с соавт., 2012].

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 [Тюляндин С.А. с соавт., 2010]. У больных с операбельными формами РМЖ химиотерапия применяется до или после операции. Целью адъювантной (послеоперационной) химиотерапии является снижение риска отдалённого метастазирования опухоли. Установлены показания для проведения предоперационной, или неoadъювантной, 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 адъювантном режиме [Gonzalez-Angulo A.M. et al., 2007; Beasley G.M., Olson J.A. Jr., 2010]. Показано, что у больных с достижением полной морфологической регрессии опухоли под влиянием НАХТ существенно повышаются показатели выживаемости [Божок А.А. с соавт., 2006; Chow L.W. et al., 2006].

Однако у части больных опухоль оказывается малочувствительной или нечувствительной к химиотерапии [Fрати A. et al., 2010]. По данным различных авторов [Chuthapisith S. et al., 2006; Семиглазов В.В, Топузов Э.Э., 2009], при применении НАХТ менее 30 % больных достигают объективного ответа опухоли. 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, метронормальная терапия, эпигенетическая терапия и ряд других агентов [Hanahan D., Weinberg R.A., 2011; Place, A.E. et al., 2011; Polyak K., Vogt P.K., 2012]. 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 [Finak G. et al., 2008; Farmer P. et al., 2009; Place A.E. et al., 2011]. 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 [DeNardo D.G. et al., 2011; Polyak K., Vogt P.K., 2012].

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, ингибции иммуносупрессорных механизмов, прямого или опосредованного стимулирующего воздействия на иммунные эффекторы [Zitvogel L. et al., 2008; Place A.E. et al., 2011; Hannani D. et al., 2011; Polyak K., Vogt P.K., 2012].

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 [Suzuki E. et al., 2005; Lutsiak M.E., 2005]. При этом достигается повышение эффективности лечения [Zitvogel L. et al., 2008; Fridman W.H. et al., 2011].

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 [Basacs T., Mehrishi J. N. et al., 2010].

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 неoadьювантной 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 неoadьювантной химиотерапии. Впервые показано, что активация механизмов рецепторного

пути апоптоза, проявляющаяся в повышении sFasL, CD95L<sup>+</sup>-клеток в циркуляции, и повышенная способность к секреции TNF- $\alpha$  до лечения способствуют полной регрессии опухоли в результате проведения неоадьювантной 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 неоадьювантной 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 неоадьювантной химиотерапии.

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

Впервые установлена связь между прогрессированием опухоли после неоадьювантной 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 неоадьювантной 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 неоадьювантную 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 неоадьювантной 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 неоадьювантную 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 неоадьювантной 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.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы

В исследование включены 269 больных раком молочной железы стадии опухолевого процесса T1-4N0-3M0 (средний возраст  $49,3 \pm 8,6$  лет), которые получили комбинированное лечение на базе НИИ онкологии СО РАМН (г. Томск), и 24 практически здоровые женщины сопоставимого возраста (группа контроля). Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с основами законодательства РФ об охране здоровья граждан (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288), имеется разрешение Комитета по биомедицинской этике ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН.

Были оценены анамнестические данные и клинико-морфологические параметры, патогенетически и прогностически значимые для больных РМЖ, ассоциированные с особенностями клинического течения заболевания (табл. 1). Наличие иммунопатологического синдрома оценивалось на этапе анкетирования [Ветлугина Т.П. с соавт., 2001].

**Таблица 1**

### Перечень исследованных параметров, характеризующих состояние опухоли, организма и иммунной системы больных РМЖ

Факторы, характеризующие опухолевый процесс	Факторы, отражающие особенности организма	Имунопатологические синдромы
T(1-4); N(0-3) Клиническая форма РМЖ Гистологическое строение опухоли Цитологические характеристики опухоли Степень злокачественности опухоли Характер фоновых изменений ткани молочной железы Рецепторы к эстрогенам и прогестерону (ER, PR) и эпидермальному фактору роста (HER2-neu)	Возраст Менструальный статус Гинекологические заболевания Онкологически отягощённая наследственность	Аутоиммунный Аллергический Инфекционный (клеточный, гуморальный, комбинированный иммунодефицит) Лимфопролиферативный

Перед операцией проводилось 2-4 курса НАХТ по одной из схем: CMF (5-фторурацил, метотрексат, циклофосфан); FAC (5-фторурацил, адриамицин, циклофосфан); CAF (адриамицин, 5-фторурацил, циклофосфан).

Эффективность НАХТ оценивалась по изменению размера опухоли в процентах от исходного согласно рекомендациям Комитета экспертов ВОЗ. В зависимости от эффективности НАХТ все больные были разделены на 4 подгруппы: 1) **полная регрессия** (100 %-е уменьшение опухоли); 2) **частичная регрессия** (уменьшение объема опухоли более чем на 50 %); 3) **стабилизация** (снижение объема менее чем на 50 % или увеличение не более чем на 25 %); 4) **прогрессирование** (увеличение объема опухоли 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.

У 131 больной до начала лечения и через 2-3 недели после НАХТ оценивались следующие иммунологические параметры: гемограмма; субпопуляционный состав лимфоцитов (иммуноцитохимический метод с использованием моноклональных антител к антигенам CD3, CD4, CD8, CD72, CD25, CD95, HLA-DR (NovoCastra, Великобритания), CD16 (ДАКО, Дания), CD95L (BD Biosciences, США)); концентрация сывороточных иммуноглобулинов (Ig) классов А, М, G методом радиальной иммунодиффузии по Манчини; концентрация в сыворотке растворимого Fas-рецептора и Fas-лиганда методом ELISA (Bender MedSystems, Австрия). Спонтанную и стимулированную митогенами (фитогемагглютинином (ФГА), липополисахаридом (ЛПС) пролиферативную активность мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) оценивали по включению радиоактивной метки (<sup>3</sup>H-тимидин) с регистрацией на бета-счётчике (Wallac, Голландия), рассчитывался индекс стимуляции (ИС) по соотношению уровня митогенстимулированной и спонтанной пролиферации клеток. Спонтанную и стимулированную митогенами (ФГА или ЛПС) секрецию IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 в культуре МНПК определяли иммуноферментным методом (ИФА) с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), IL-2 и IL-10 – с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (Россия). Функциональную активность нейтрофилов определяли по их способности генерировать активные формы кислорода (АФК) в реакции восстановления нитросинего тетразолия («ДиаМ», Германия) (НСТ-тест) [Нестерова И.В. с соавт., 1999]. Оценку апоптоза МНПК осуществляли методом суправитального окрашивания с использованием флюоресцентного красителя Hoechst 33342 [Zhang X. et al., 2001; Stridh H. et al., 2002].

Анализ полиморфных вариантов специфических участков генома генов цитокинов (IL1B -31C/T, rs1143627; IL1B +3954C/T, rs1143634; TNFA -308A/G, rs1800629; TNFA -238G/A, rs361525; TNFA -863C/A, rs1800630; IL4-590C/T, rs 2243250; IL10 592C/A, rs1800872) проводили с использованием полимеразной цепной реакции и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, используя специфические праймеры и соответствующие ферменты рестрикции («СибЭнзим», г. Новосибирск). Выделение ДНК осуществляли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Продукты рестрикции разделяли с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле, содержащем 0,5 мг/мл бромида этидия, и визуализировали в УФ-свете.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета прикладных программ STATISTICA for Windows 6.0 (StatSoft Inc., США). Для каждой выборки рассчитывали медиану (Me), верхний (25 %) и нижний (75 %) квартили (Q1–Q3). Для оценки значимости различий показателей использовались непараметрические критерии Вилкоксона, Манна – Уитни. Для сравнения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов и оценки частоты встречаемости

других признаков использовали критерии  $\chi^2$  и Фишера. 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. Для определения параметров, позволяющих прогнозировать эффективность НАХТ, применяли регрессионный анализ. Обсуждаются результаты с достоверностью различий при  $p < 0,05$  и с тенденцией различий при  $0,05 < p < 0,1$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

**Особенности функционирования иммунной системы до начала лечения у больных с различной эффективностью НАХТ.** Иммунный статус больных с полной регрессией опухоли, оцененный до лечения, характеризовался смещением соотношения Т-лимфоцитов (CD4/CD8) в сторону CD8+, сохранной пролиферативной способностью Т-клеток, максимальными значениями IgG, продукции IL-10 и IL-1 $\beta$ , а также параметров, характеризующих интенсивность апоптотических процессов: TNF- $\alpha$ , сывороточного Fas-лиганда (sFasL) и лимфоцитов, экспрессирующих Fas-лиганд (CD95L+) (табл. 2).

CD8+-лимфоциты (Т-цитотоксические) рассматриваются как основные эффекторы противоопухолевого иммунитета. Антитела, в частности IgG, способны как экранировать опухоль от действия клеточного иммунитета, так и оказывать опосредованный антителами противоопухолевый эффект [Москалёва Е.Ю., Северин С.Е., 2002; Balkwill F., 2001, Roberti M.P., 2012].

Цитокины – универсальные медиаторы межклеточных взаимодействий, в том числе между иммунной системой и опухолью [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Многие цитокины обладают прямой противоопухолевой активностью или являются регуляторами противоопухолевого иммунитета и могут рассматриваться в качестве «естественных адъювантов» противоопухолевых иммунных реакций. IL-1 $\beta$  оказывает гемопоэтический и противоопухолевый эффект, а также может стимулировать продукцию ряда цитокинов [Рукавицын О.А., 2002]. Сопоставимые с нашими результатами данные были получены в 2009 г. Serah S.C. и Bower J.E., которые показали, что пациенты с максимальным противоопухолевым эффектом радиотерапии имели наиболее высокие уровни IL-1 $\beta$  и IL-6 до лечения. 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) [Райхлин Н.Т., Райхлин А.Н., 2002].

Апоптоз Fas-положительных опухолевых клеток может быть реализован как с участием FasL-несущих иммуноцитов, так и растворимых молекул FasL [Скуинь Л.М., Кашкин К.П., 2001; Ulukaya E. et al., 2010; Tauzin S. et al., 2011]. Группа пациентов с полной регрессией опухоли отличалась максимально высокими значениями, характеризующими

Таблица 2

Иммунологические показатели больных РМЖ (до лечения) в зависимости от эффективности НАХТ (Ме[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>])

Иммунологические показатели	Эффективность НАХТ				Здоровые доноры (n=24)
	Полная регрессия (n=9)	Частичная регрессия (n=52)	Стабилизация (n=56)	Прогрессирование (n=14)	
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)
IgG, г/л	<b>21,00 (17,10;25,60)*</b>	<b>13,90 (10,70;19,00)**</b>	16,10 (12,30;20,40)	<b>13,25 (9,80;17,10)**</b>	12,40 (9,50;16,55)
IL-10, пг/мл	94,70(34,20;241,00)	42,85 (3,80;212,30)	14,70 (0,00;141,00)	<b>8,95 (3,65;14,25)**</b>	20,40 (4,80;54,90)
IL-10ст, пг/мл	269,60(134,65;369,15)	129,00 (32,40;698,00)	<b>17,25 (7,10;132,70)**</b>	<b>17,10 (11,40;77,10)**</b>	47,10 (14,20;245,80)
IL-1β, пг/мл	<b>2914,00 (784,00;5528,00)*</b>	<b>209,00 (100,00;1300,00)**</b>	<b>235,00 (119,00;1025,00)**</b>	727,50 (253,50;3000,50)	344,50 (146,00;1224,00)
TNF-α, пг/мл	<b>558,50 (55,00;3140,00) *</b>	<b>127,15(15,00;425,70) *</b>	<b>105,50 (59,00;450,00)*</b>	42,00 (6,00;259,00)	15,65 (1,70;52,00)
CD95L, %	<b>24,00 (20,50;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)
sFasL, нг/мл	<b>0,08 (0,00;0,10)*</b>	0,00 (0,00;0,00)	<b>0,00 (0,00;0,00)**</b>	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;0,00)
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)
CD16, *10 <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)
ФР %	34,00(19,00;41,00)	<b>45,00(18,00;60,00)*</b>	<b>33,00(23,00;50,00)*</b>	<b>33,00(22,00;52,00)*</b>	17,00 (8,00;29,50)
ИРФР, у.е	35,00(26,00;67,00)	<b>63,00(27,00;95,00)*</b>	<b>58,00(28,00;87,00)*</b>	<b>55,00(33,00;69,00)*</b>	23,50(12,00;45,50)
Пролиф. ФГА, имп/мин	27808,50 (8979,50;42456,00)	<b>19713,50 (7715,00;50890,00) *</b>	<b>19232,50 (7885,00;42502,00)*</b>	<b>11536,00 (7763,00;40138,00)*</b>	31837,00 (22023,00;57041,0)
IL-4, 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)
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /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)
Лимфоциты, *10 <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)
CD25, *10 <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)
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)
CD8, *10 <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)
CD72, *10 <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)

Примечание:

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

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

n – количество обследованных.

потенциально проапоптотические для опухоли агенты (TNF- $\alpha$ , sFasL, CD95L-лимфоциты) (см. табл. 2).

У пациенток без объективного ответа на НАХТ относительное количество В-лимфоцитов (CD72+) было значимо выше в сравнении с показателями больных с наличием объективного ответа на НАХТ (18,50 [15,00;28,00] и 16,00 [12,00;19,00] соответственно), а абсолютное число CD25+-лимфоцитов – значимо выше контроля (0,27 [0,14;0,45] и 0,14 [0,09;0,25] соответственно). Известно, что CD25-маркёр может экспрессироваться как на регуляторных Т-клетках – главных ингибиторах противоопухолевого иммунитета [Casares N., 2003], так и на любых активированных Т-лимфоцитах.

Кроме того, низкая эффективность НАХТ ассоциировалась с высокими значениями показателей врождённого иммунитета (количеством натуральных киллеров и фагоцитарной активностью нейтрофилов) и с проявлениями функциональной недостаточности Т-клеточного звена иммунитета (минимальными значениями ФГА-индуцированной пролиферативной активности) (см. табл. 2). Следует отметить, что иммунный статус больных с прогрессированием опухоли на фоне НАХТ отличался максимальными значениями, характеризующими количество натуральных киллеров, и минимальными – IL-10 и IL-4 (см. табл. 2).

Таким образом, реализация противоопухолевого эффекта НАХТ сопряжена с активацией до начала лечения цитотоксических и гуморальных механизмов адаптивного иммунитета, с высоким уровнем секреции цитокинов, обладающих провоспалительным и противоопухолевым действием, и с активацией эффекторов рецепторного апоптоза.

Однако на эффективность НАХТ могут влиять и другие факторы, значимость которых мы оценили далее.

***Взаимосвязь эффективности НАХТ с клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса и анамнестическими данными больных РМЖ.*** Из перечня патогенетически значимых факторов, характеризующих опухолевый процесс и особенности организма больного (см. табл. 1), наиболее значимой по связи с эффективностью НАХТ согласно критерию  $\chi^2$  оказалась степень метастатического поражения регионарных лимфоузлов ( $p=0,003$ ). У больных без метастазов ( $N_0$ ) в 60 % случаев регистрировался объективный ответ на НАХТ ( $p=0,03$ ) (табл. 3). При этом ни у одного больного с высокой степенью поражения  $N_3$  (более 10 лимфоузлов) не наблюдалось объективного клинического ответа. Следует отметить, что лимфогенное метастазирование характеризует степень морфологической сохранности периферического отдела иммунной системы, поскольку в результате формирования метастазов происходит замещение лимфоидной ткани малигнизированными клетками.

Мы проанализировали взаимосвязь иммунологических параметров, оцененных до начала лечения, со степенью регионарного метастазирования без учёта эффективности НАХТ и выявили некоторые особенности.

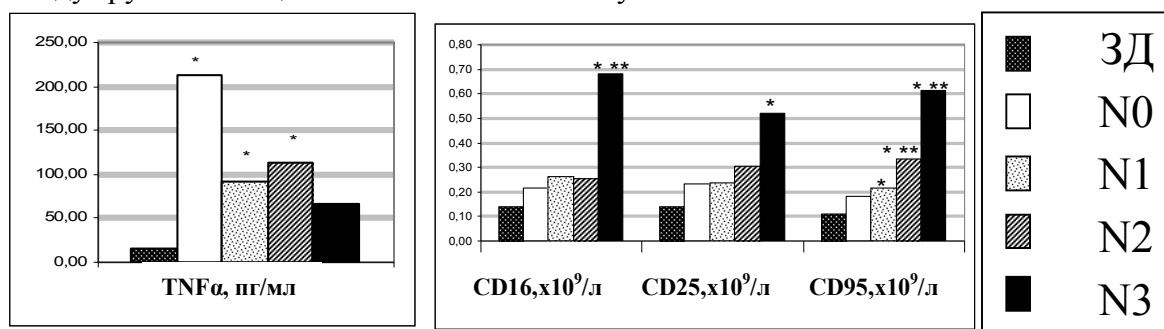
У больных без регионарных метастазов ( $N_0$ ) наблюдалась максимальная спонтанная секреция TNF- $\alpha$  (рис. 1).

Таблица 3

**Частота встречаемости разной степени поражения регионарных лимфатических узлов у больных РМЖ с наличием или отсутствием объективного ответа на НАХТ ( $n$ , %)**

Объективный ответ на НАХТ	Степень поражения регионарных лимфатических узлов			
	$T_{1-4}N_0M_0$	$T_{1-4}N_1M_0$	$T_{1-4}N_2M_0$	$T_{1-4}N_3M_0$
	$n(\%)$	$n(\%)$	$n(\%)$	$n(\%)$
Наличие	29(60), $p=0,03$	19(44)	13(43)	0(0)
Отсутствие	19(40)	24(56)	17(57)	9(100), $p=0,003$
Итого	48(100)	43(100)	30(100)	9(100)

Примечание:  $n$  – количество обследованных;  $p$  – уровень значимости различий между группами пациентов с наличием и отсутствием объективного ответа на НАХТ.



**Рис. 1. Иммунологические показатели больных РМЖ с различной степенью поражения регионарных лимфатических узлов: \*** – значимые различия между подгруппой больных и здоровых доноров (ЗД) ( $p < 0,05$ );  
**\*\*** – значимые различия с подгруппой больных без метастазов ( $p < 0,05$ )

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 –  $N_3$  (рис. 1). Следует отметить, что апоптотической гибели подвержены терминально дифференцированные лимфоциты, а высокая экспрессия CD25+-маркёра характерна не только для активированных Т-клеток, а в большей степени – для Т-регуляторных лимфоцитов (Т-reg), которые рассматриваются как основные ингибиторы противоопухолевого иммунного ответа.

Во вновь сформированной нами группой пациенток без регионарных метастазов, у которых была отмечена полная регрессия опухоли, указанные выше особенности иммунного статуса сохранялись. Кроме того, был отмечен более высокий уровень стимулированной секреции TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и спонтанной – интерферона (IFN)- $\gamma$  (данные не представлены). Известно, что IFN- $\gamma$  является маркером поляризации лимфоцитов в Т-хелперы 1-го типа, регулирующие цитотоксические реакции в процессе адаптивного иммунного ответа, в том числе и в отношении опухолевых клеток.

При анализе анамнестических данных было выявлено, что у больных с полной регрессией опухоли клинические проявления иммунодефицита в

форме инфекционного синдрома выявлялись реже, чем в других клинических группах ( $p=0,04$ ).

Все остальные клиничко-морфологические факторы, представленные в табл. 1, согласно критерию  $\chi^2$  не влияли на эффективность НАХТ. На этом основании можно говорить о вкладе в реализацию эффективности химиотерапии именно иммунологических факторов, уровень которых существенно различается у больных РМЖ в зависимости от эффективности НАХТ.

**Изменения параметров иммунитета после НАХТ** носили разнонаправленный характер. При этом различия между целым рядом показателей, выявленные нами до лечения (см. табл. 2), нивелировались, и их значения приблизились к показателям группы здоровых. У больных с полной регрессией опухоли после НАХТ произошло снижение абсолютного количества лейкоцитов, преимущественно за счёт Т-клеток. У пациенток с наличием клинического ответа на НАХТ отмечалось 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 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, и 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 ( $p<0,05$ )).

Следует отметить, что особенности средневыворочных характеристик таких параметров, как концентрация IgG и секреция IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$ , выявленные нами в подгруппах больных до лечения, сохранились и после проведения НАХТ. 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.

**Взаимосвязь полиморфных вариантов генов цитокинов с эффективностью НАХТ.** По данным ряда авторов, с более высоким уровнем экспрессии генов, кодирующих IL-1 $\beta$ , ассоциируется аллель +3954A [Имангулова М.М. с соавт., 2005; De Jongh C.M. et al., 2008], TNF- $\alpha$  - 308A [Mahdavian S.A. et al., 2009; Никулина Е.Л. с соавт., 2011; Тимошина М.А., 2011] и с высоким уровнем IL-10 – аллель -592A [Miyazoe S. et al., 2002; Shin H.D. et al., 2003; Зонова Е.В., 2010], тогда как с низкой экспрессией генов этих цитокинов соответственно ассоциированы аллели +3954С, -308G и -592С. Мы выявили, что у больных с прогрессированием опухоли достоверно чаще встречалось гомозиготное состояние по +3954С-аллелю гена IL1B, с которым связана низкая продукция цитокина, а полная регрессия опухоли ассоциировалась с генотипом -592AA гена IL10, который связан с высокой продукцией IL-10 (рис. 2). Примечательно, что по результатам регрессионного (рис. 3) и корреляционного (рис. 4) анализа

IL-10 является одним из наиболее важных прогностических маркёров эффективности НАХТ.

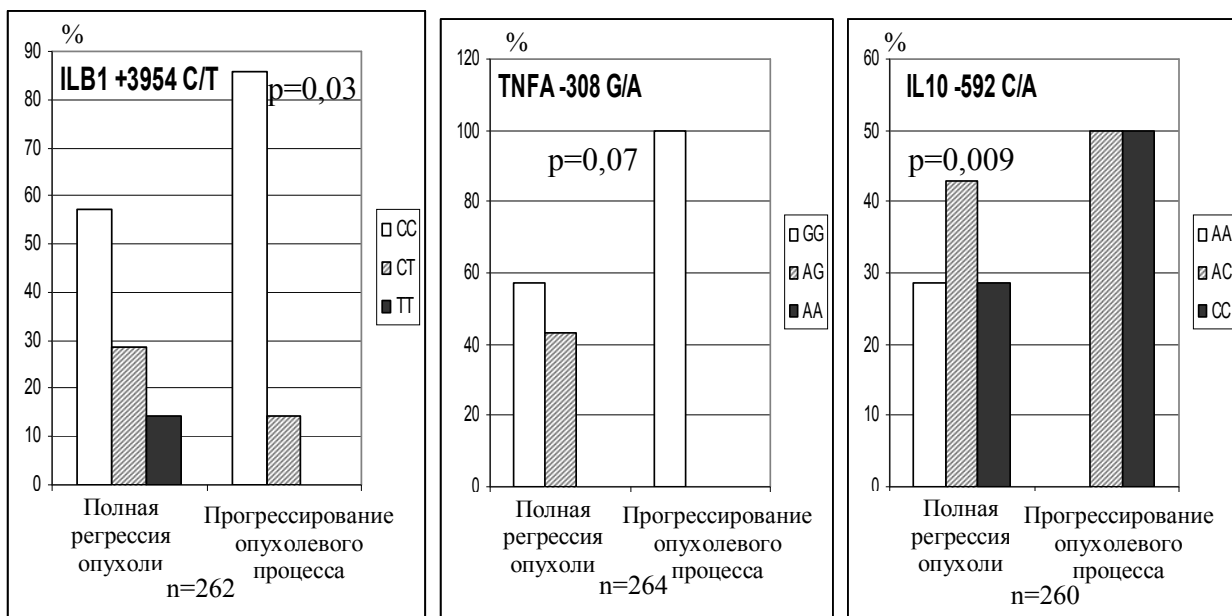


Рис. 2. Ассоциация эффективности НАХТ с полиморфизмом генов цитокинов

Важное практическое значение имеет уравнение, полученное нами в результате проведения регрессионного анализа:

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

где  $y$  – наличие или отсутствие эффекта НАХТ;  $x$  – концентрация IL-10 в пг/мл (чувствительность – 100 %, специфичность – 83 %) (см. рис. 3).

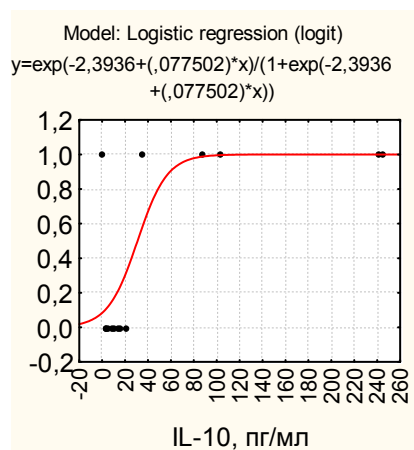


Рис. 3. Зависимость эффективности НАХТ от уровня спонтанной секреции IL-10

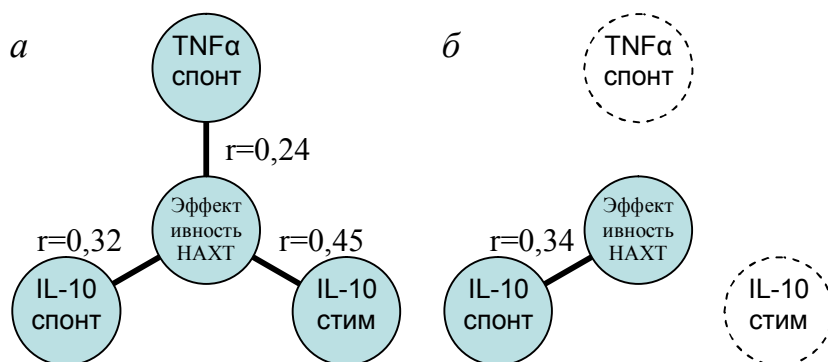


Рис. 4. Корреляционная зависимость эффективности НАХТ от иммунологических параметров до (а) и после (б) лечения

IL-10 обладает как иммуносупрессорными, противовоспалительными, так и антиангиогенными свойствами. Кроме того, согласно данным экспериментального исследования 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 [Mumm J.B. et

al., 2011]. 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 иммунных реакций может играть компенсаторно-охранительную роль для иммунной системы, подвергающейся воздействию НАХТ.

### **Заключение**

В настоящей работе были изучены особенности функционирования иммунной системы, сопряжённые с различной клинической эффективностью неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы, на основе сравнительного комплексного анализа клинико-морфологических и лабораторных данных.

Согласно полученным данным до проведения цитостатической предоперационной терапии у больных с последующей полной регрессией опухоли имелись косвенные признаки более выраженной морфофункциональной готовности, чем у пациенток других групп к реализации противоопухолевого ответа (смещение соотношения CD4/CD8 в сторону Т-цитотоксических лимфоцитов, сохранная способность к митоген-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов, к ответу фагоцитов на стимуляцию). У пациенток с клинически благоприятным ответом на неоадьювантную химиотерапию (регрессию опухоли) наблюдалось повышение синтеза провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) при сохранении способности к синтезу IL-10 по сравнению с другими группами пациенток. Поскольку известно, что функциональная активность генов, кодирующих белковые продукты, в том числе цитокины, может зависеть от генетического полиморфизма, мы оценили его связь с эффективностью неоадьювантной химиотерапии. Оказалось, что полная регрессия опухоли, при которой наблюдалась высокая секреция IL-10 клетками крови пациентов, ассоциировалась с генотипом, обеспечивающим высокий уровень продукции IL-10. Напротив, низкоактивные генотипы генов IL1B (+3954C) и TNFA (-308G) чаще встречались у пациенток с отсутствием ответа на цитостатическое лечение. Таким образом, важное значение имеют конститутивные характеристики организма больного, в частности генетические полиморфизмы, обуславливающие уровень экспрессии цитокинов, играющих ключевую роль в функционировании иммунной системы.

После неоадьювантной терапии в группе пациентов с клиническим ответом были зарегистрированы признаки лимфоидного истощения, затрагивающего субпопуляции клеток, обладающих противоопухолевой эффекторной активностью (значимое снижение абсолютного числа лимфоцитов, CD3+-, CD8+-клеток, абсолютного числа CD25+-клеток). У пациентов с полной регрессией опухоли снижение уровня указанных клеточных субпопуляций могло быть связано с их активированным состоянием до начала неоадьювантной 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.

Показано, что в значительной степени клинический эффект неоадьювантной химиотерапии определяется состоянием регионарных лимфоузлов, при этом распространение злокачественного процесса в регионарные лимфоузлы ассоциировано с отсутствием объективного ответа на неоадьювантную химиотерапию. Принимая во внимание важную роль лимфоузлов в ограничении опухолевой экспансии, можно полагать, что их метастатическое поражение, сопряженное с потерей функции локального иммунного надзора, отражается на состоянии иммунной системы в целом. Вовлечение регионарных лимфоузлов в злокачественный процесс сопровождается признаками функционального напряжения и истощения резервов системы иммунитета и проявляется повышением количества CD16<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов в системной циркуляции. Экспрессия указанных маркеров свидетельствует о терминальной функциональной дифференцировке и выходе клеток из пула потенциальных эффекторов в связи с их апоптотической гибелью.

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, отмеченные у данной категории больных, свидетельствуют о возможности реализации данного механизма в модуляции иммунного ответа против опухоли у больных раком молочной железы в процессе неоадьювантной химиотерапии.

Поскольку основными механизмами действия противоопухолевых препаратов являются инициация апоптоза или остановка деления как патологически изменённой, так и нормальной клетки, на основании выявленных в настоящем исследовании особенностей иммунологических показателей у больных раком молочной железы с различной эффективностью НАХТ и данных литературы можно предположить возможные механизмы участия иммунной системы в реализации эффективности предоперационной химиотерапии (рис. 5). Компоненты иммунной системы могут как напрямую вызывать апоптоз опухолевых клеток, так и реализовывать антигензависимые и антигеннезависимые эффекторные реакции в отношении клеток опухоли. С практической точки зрения полученные нами данные позволяют рекомендовать оценку клинико-лабораторных иммунологических параметров в качестве дополнительных критериев для прогнозирования результата неоадьювантной цитостатической терапии.

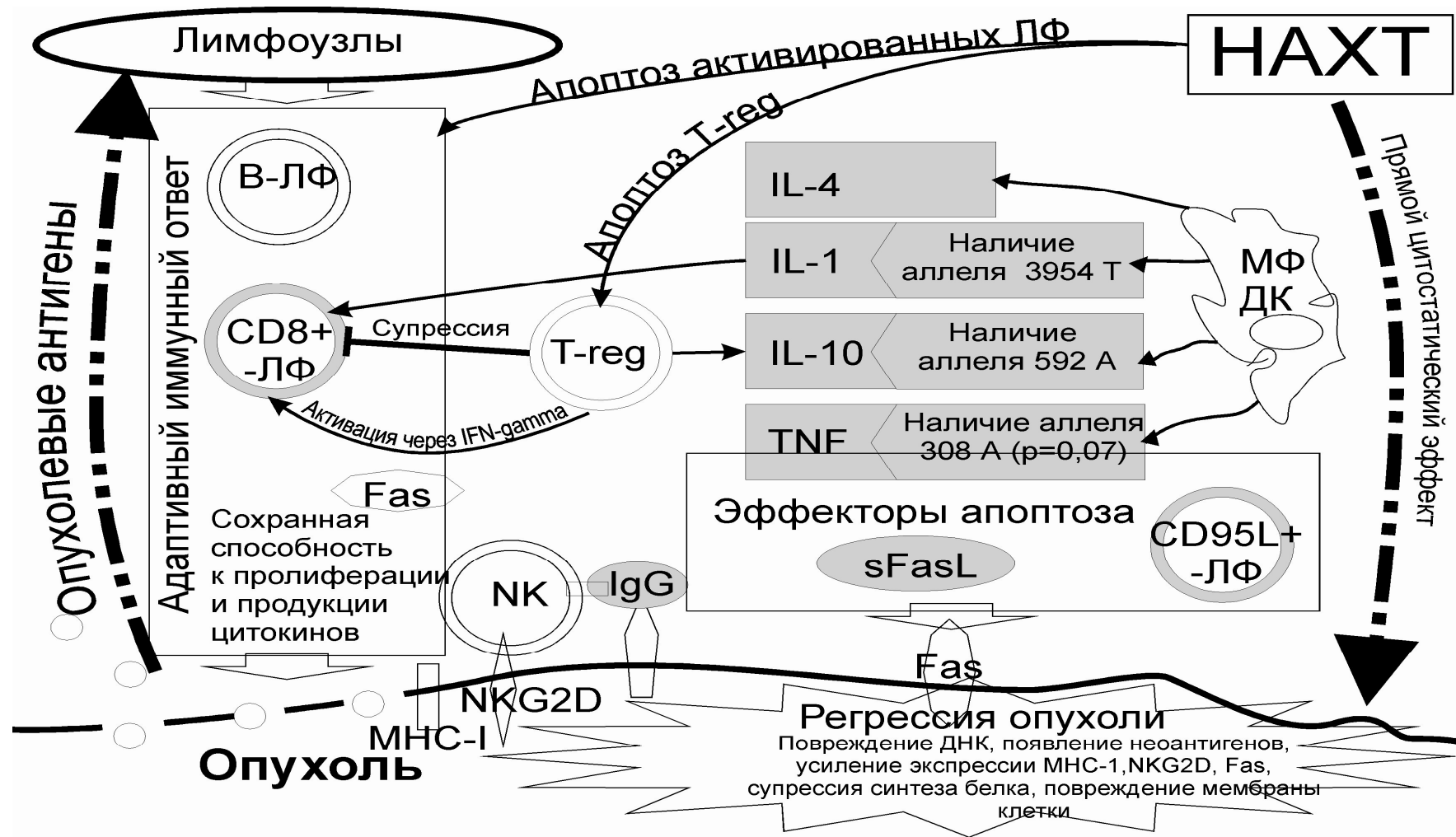


Рис. 5. Роль иммунной системы в реализации противоопухолевого эффекта НАХТ (по данным Zitvogel L., 2008; Fridman W.H. et al., 2011 и по результатам собственных исследований): серым цветом выделены результаты настоящего исследования; ДК – дендритная клетка; ЛФ – лимфоцит; МФ – макрофаг; МНС-I – главный комплекс гистосовместимости-1

Выявленные в ходе исследования особенности функционирования иммунной системы у пациенток с наличием клинических признаков иммунопатологии и разной степенью поражения регионарных лимфоузлов позволяют глубже понять возможные иммунологически-опосредованные механизмы реализации противоопухолевого эффекта неoadьювантной химиотерапии на клеточном и молекулярном уровнях. Результаты настоящего исследования могут быть использованы для разработки патогенетически обоснованных иммунотерапевтических подходов в комплексной терапии рака молочной железы и других злокачественных опухолей.

### **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 неoadьювантной 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 неoadьювантной 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 неoadьювантной 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+/- и CD25+/-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.

### **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**

1. Кологривова Е.Н. Анализ корреляционных связей показателей иммунограммы и адаптационного индекса у больных раком различной локализации и здоровых доноров / Е.Н. Кологривова, Я.В. Кухарев, Д.А. Шишкин, М.Н. Стахеева, С.К. Заповодников // *Сибирский онкологический журнал*. – 2005. – №2. – С. 30-33.
2. Кухарев Я.В. Особенности иммунологических показателей у больных раком молочной железы с различными адаптационными реакциями / Я.В. Кухарев, М.Н. Стахеева, Е.Н. Кологривова, А.В. Сорокина // *Вестник ТГУ: материалы Всерос. науч. конф. «Механизмы индивидуальной адаптации»*. – Томск, 2006. – С. 32.
3. Стахеева М.Н. Показатели апоптоза мононуклеарных клеток периферической крови у больных раком молочной железы при проведении НХТ в зависимости от степени регионарного метастазирования / М.Н. Стахеева, Н.В. Чердынцева, Е.М. Слонимская, Н.Н. Бабышкина, Я.В. Кухарев // *Медицинская иммунология: материалы X Всерос. науч. форума «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге»*. – СПб., 2006. – Т. 8, № 2-3. – С. 351-352.
4. Чердынцева Н.В. Хемокины и прогрессия злокачественных новообразований / Н.В. Чердынцева, П.А. Гервас, Н.В. Литвяков, М.Н. Стахеева, В.А. Белявская, Е.В. Денисов, Н.Н. Бабышкина, Е.М. Слонимская, Я.В. Кухарев, С.А. Тузиков, Н.В. Севостьянова, М.И. Воевода // *Медицинская иммунология: материалы X Всерос. науч. форума «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге»*. – СПб., 2006. – Т. 8, № 2-3. – С. 355-356.
5. Стахеева М.Н. Влияние степени регионарного метастазирования на показатели количественного гомеостаза клеток иммунной системы у больных раком молочной железы / М.Н. Стахеева, Н.В. Чердынцева, Е.М. Слонимская, Н.Н. Бабышкина, Е.Ю. Гарбуков, Я.В. Кухарев, М.Р. Галимуллина // *Профилактика и лечение злокачественных новообразований в современных условиях: материалы Рос. науч.-практ. конф. с международным участием*. – Барнаул, 2007. – С. 256-257.
6. Стахеева М.Н. Влияние беталейкина на состояние адаптационного статуса и системы иммунитета у больных местно-распространенным раком молочной железы / М.Н. Стахеева, Я.В. Кухарев, Е.М. Слонимская, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина,

- А.В. Дорошенко, Н.В. Чердынцева // Создание новых лекарственных препаратов: материалы респ. науч. конф. – Томск, 2007. – С. 59-61.
7. Стахеева М.Н. Показатели апоптоза, пролиферации и продукции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови у больных РМЖ / М.Н. Стахеева, Н.В. Чердынцева, Е.М. Слонимская, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина, Я.В. Кухарев, М.Р. Галимуллина // Медицинская иммунология: материалы XI Всерос. науч. Форума с междунар. участием им. академика В. И. Иоффе "Дни иммунологии в Санкт-Петербурге". – СПб., 2007. – Т. 9, № 2/3. – С. 289.
  8. Кухарев Я.В. Показатели иммунного статуса у больных раком молочной железы с разной эффективностью неoadъювантной химиотерапии / Я.В. Кухарев, А.В. Черников, А.В. Сорокина, Ч.К. Серенот, Е.Ю. Гарбуков, А.В. Дорошенко, Н.А. Красулина, Ю.Л. Кокорина // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – Прил. 2. – С. 64-65.
  9. Стахеева М.Н. Неадъювантная химиотерапия как фактор модуляции активности иммунной системы у больных раком молочной железы или прогрессировании заболевания / М.Н. Стахеева, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская, Н.Н. Бабышкина, Ю.Л. Кокорина, А.В. Дорошенко, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – Прил. 2. – С. 82-83.
  10. Стахеева М.Н. Исследование связи параметров иммунной системы с эффективностью неoadъювантной химиотерапии у больных раком молочной железы / М.Н. Стахеева, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, А.А. Медюхина, А.В. Дорошенко, Ю.А. Кокорина, Е.М. Слонимская, Е.Н. Кологривова, Н.В. Чердынцева // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 3 (вып. 1). – С. 39–43.
  11. Стахеева М.Н. Особенности состояния иммунной системы до начала лечения у больных РМЖ с прогрессированием заболевания / М.Н. Стахеева, Я.В. Кухарев, Н.В. Чердынцева, Е.М. Слонимская, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина, Ю.А. Кокорина, А.В. Дорошенко // Сибирский медицинский журнал: материалы науч. конф. с междунар. участием "Дни иммунологии в Сибири - 2008". – Томск, 2008. – № 3. – С. 116 – 117.
  12. Кухарев Я.В. Связь параметров иммунной системы с клинико-морфологическими характеристиками опухоли у больных раком молочной железы / Я.В. Кухарев, М.Н. Стахеева, Е.Н. Кологривова, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, Е.Ю. Гарбуков, А.В. Дорошенко, Ю.А. Кокорина, А.А. Медюхина // Сибирский медицинский журнал: материалы науч. конф. с междунар. участием "Дни иммунологии в Сибири - 2008". – Томск, 2008. – № 3. – С. 106.
  13. Чердынцева Н.В. Иммунная система у больных раком молочной железы: связь с прогрессией и эффективностью цитостатической терапии / Н.В. Чердынцева, М.Н. Стахеева, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, Е.А. Малиновская, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская // Сибирский медицинский журнал: материалы науч. конф. с междунар. участием "Дни иммунологии в Сибири - 2008". – Томск, 2008. – № 3. – С. 123–124.
  14. Кухарев Я.В. Особенности иммунного статуса у больных раком молочной железы с клиническими проявлениями иммунной недостаточности / Я.В. Кухарев, М.Н. Стахеева, Е.Н. Кологривова, А.В. Черников, А.В. Сорокина, Е.М. Слонимская, Е.Ю. Гарбуков, А.В. Дорошенко, Н.А. Красулина, Ю.Л. Кокорина // Российский аллергологический журнал: материалы VIII Конгресса РААКИ. – М., 2008. – № 1, прил. 1. – С. 149-150.
  15. Кухарев Я.В. Взаимосвязь эффективности неoadъювантной химиотерапии и параметров иммунного статуса у больных раком молочной железы / Я.В. Кухарев, М.Н. Стахеева, Е.Н. Кологривова, Е.М. Слонимская, А.А. Медюхина, Е.Ю. Гарбуков, А.В. Дорошенко, Н.А. Красулина, Ю.Л. Кокорина, Н.В. Чердынцева // Российский иммунологический журнал: материалы Объединенного иммунологического форума. – СПб., 2008. – Т. 2(11), № 2-3. – С. 310.

16. Чердынцева Н.В. Иммунная система вносит вклад в эффективность цитостатической терапии рака / Н.В. Чердынцева, М.Н. Стахеева, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, Е.М. Слонимская, Е.А. Малиновская, Е.В. Денисов, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина // Российский иммунологический журнал: материалы Объединенного иммунологического форума. – СПб., 2008. – Т. 2(11), № 2-3. – С. 316.
17. Кухарев Я.В. Особенности иммунного статуса больных с разной эффективностью предоперационной химиотерапии / Я.В. Кухарев, А.В. Дорошенко, Н.А. Тарабановская, Ю.Л. Кокорина // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Прил. № 1. – С. 117-118.
18. Гервас П.А. Влияние полиморфизма генов апоптоза и репарации на эффективность неoadъювантной химиотерапии злокачественных новообразований / П.А. Гервас, Н.В. Литвяков, М.Н. Стахеева, С.В. Миллер, А.Ю. Добродеев, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина, Я.В. Кухарев, М.В. Васильева, Е.М. Слонимская, В.А. Белявская, С.А. Тузиков, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 4. – С. 41–47.
19. Стахеева М.Н. Состояние иммунной системы у больных РМЖ и его взаимосвязь с эффективностью НАХТ и исходом заболевания / М.Н. Стахеева, Я.В. Кухарев, Е.М. Слонимская, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина, Ю.Л. Кокорина, А.В. Дорошенко, М.Р. Патышева, Н.В. Чердынцева // Проблемы современной онкологии: материалы Рос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Барнаул, 2009. – С. 138.
20. Стахеева М.Н. Динамика состояния иммунной системы у больных раком молочной железы при проведении противоопухолевого лечения как показатель его эффективности / М.Н. Стахеева, Я.В. Кухарев, Н.В. Чердынцева, Е.М. Слонимская, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина, Ю.Л. Кокорина, А.В. Дорошенко, Н.А. Тарабановская, М.Р. Патышева // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Прил. № 2. – С. 184–185.
21. Стахеева М.Н. Функциональные резервы цитокин-продуцирующей и пролиферативной активности иммунной системы у больных РМЖ с различным исходом / М.Н. Стахеева, Я.В. Кухарев, Н.В. Чердынцева, Е.М. Слонимская, Н.Н. Бабышкина, Е.Ю. Гарбуков, М.Р. Патышева, А.В. Дорошенко, Ю.Л. Кокорина, Н.А. Тарабановская // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: материалы четвертой Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Новосибирск, 2009. – С. 247.
22. Stakheyeva M.N. Immune system factor organization with respect to breast cancer outcome / M.N. Stakheyeva, D. Eidenzon, E.M. Slonimskaya, J.V. Kukharev, E.J. Garbukov, N.V. Cherdyntseva // International conference “Tumor and host: novel aspects of old problem”, Kyiv, 2010 // Experimental oncology. – 2010. – Vol. 32, Sp. 1. – P. 101–102.
23. Стахеева М.Н. Взаимосвязь уровня продукции IL-1 $\beta$  клетками периферической крови у больных раком молочной железы с различным исходом / М.Н. Стахеева, Е.М. Слонимская, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков, Е.П. Горева, С.В. Сенников, В.А. Козлов, Н.В. Чердынцева // Цитокины и воспаление: материалы Всерос. науч. конф. «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии». – Новосибирск, 2010. – Т. 9, № 3. – С. 72–73.
24. Кухарев Я.В. Сопряжённость параметров иммунного статуса с эффективностью неoadъювантной терапии рака молочной железы / Я.В. Кухарев, А.В. Дорошенко, Н.А. Тарабановская, Ю.Л. Кокорина // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Прил. 1. – С. 65–66.
25. Стахеева М.Н. Взаимосвязь состояния иммунной системы как интегрированного целого с клиническим течением рака молочной железы / М.Н. Стахеева, Д. Эйдензон, Е.М. Слонимская, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – № 2. – С. 11–19.
26. Чердынцева Н.В. Молекулярно-генетические особенности прогрессии и ответа на терапию злокачественных новообразований: этнические аспекты / Н.В. Чердынцева, Ф.Г. Иванова, Н.В. Литвяков, Я.В. Кухарев, Е.А. Малиновская // Медицинская генетика. – 2011. – Т. 10, № 10. – С. 28–36.

27. Стахеева М.Н. Влияние противоопухолевого лечения на состояние иммунной системы у больных раком молочной железы / М.Н. Стахеева, Д.В. Эйдензон, Я.В. Кухарев, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева // IV Съезд физиологов: материалы съезда физиологов с междунар. участием / под ред. Л.И. Афтанаса, В.А. Труфакина, В.Т. Манчука, И.П. Артюхова. – Красноярск, 2012. – С. 500–501.
28. Стахеева М.Н. Использование визуализации для оценки состояния иммунной системы / М.Н. Стахеева, Д.В. Эйдензон, Н.В. Чердынцева, Е.М. Слонимская, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6 (14), № 3(1). – С. 141–142.
- 29. Кухарев Я.В. Связь иммунологических показателей с эффективностью неoadьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы / Я.В. Кухарев, М.Н. Стахеева, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 2(56). – С. 50-57.**
30. Способ прогнозирования гематогенного метастазирования у больных раком молочной железы, основанный на оценке состояния иммунной системы при проведении противоопухолевого лечения : пат. 2436099 Рос. Федерация / М.Н. Стахеева, Д. Эйдензон, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева, Е.Ю. Гарбуков, Я.В. Кухарев. – Приоритет от 15.07.2010.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЗД – здоровые доноры  
 ИРФР – интенсивность реакции фагоцитарного резерва  
 ИС ФГА – индекс стимуляции фитогемагглютинина  
 ЛПС – липополисахарид  
 МНПК – мононуклеары периферической крови  
 НАХТ – неoadьювантная химиотерапия  
 НСТ-тест – тест с нитросиним тетразолием  
 РМЖ – рак молочной железы  
 ФГА – фитогемагглютинин  
 ФР – фагоцитарный резерв  
 CD – моноклональные антитела соответствующего дифференцировочного кластера  
 FasL – Fas-лиганд  
 Her-2/neu – рецептор к эпидермальному фактору роста  
 IFN- $\gamma$  – интерферон-гамма  
 Ig – иммуноглобулин  
 IL – интерлейкин  
 N – степень поражения регионарных лимфатических узлов  
 NK – естественные киллеры  
 sFasL – растворимый Fas-лиганд  
 T – степень распространённости опухолевого процесса  
 Treg – T-регуляторные клетки  
 TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли-альфа

### 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.

Тираж 100 экз. Заказ 790.  
Томский государственный университет  
систем управления и радиоэлектроники.  
634050, г. Томск, пр. Ленина, 40.  
Тел. (3822) 533018.