

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-1-49-61>

Взаимосвязь лимфоидных популяций (инфильтрации) первичной опухоли с иммунными реакциями в костном мозге у больных раком молочной железы

С.В. Чулкова^{1,2}, Е.Н. Шолохова¹, И.В. Поддубная³, И.С. Стилиди^{1,2}, А.В. Егорова²,
Н.А. Козлов¹, Н.Н. Тупицын¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Введение. На сегодняшний день иммунотерапия прочно входит в стандарты лечения рака. Базисом для назначения иммунотерапии являются иммунологические маркеры опухоли, в том числе лимфоидная инфильтрация, изучению которой в последнее десятилетие уделяется все большее внимание. Несомненный интерес представляет исследование лимфоидной инфильтрации не только в зависимости от морфо-клинических показателей рака молочной железы (РМЖ), но и иммунной системы костного мозга.

Цель исследования – оценить инфильтрацию первичной опухоли лимфоцитами в зависимости от морфо-клинических характеристик РМЖ и иммунных реакций в костном мозге.

Материалы и методы. В исследование включены 125 больных РМЖ, которые получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Преобладали больные с РМЖ II стадии, умеренной дифференцировки (G₂). Люминальный подтип РМЖ составил 67 %, нелюминальный – 33 %. Выполнено иммунофенотипирование первичной опухоли (криостатные срезы). Использовали люминесцентный микроскоп ZEISS Axio-scope (Zeiss AG, Германия). Оценены CD45⁺, CD38⁺, T- и B-клеточная инфильтрация. Костный мозг: изучены CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺, CD56⁺-популяции. В работе использовали проточный цитометр FACSCanto II (США), программу Kaluza Analysis v2.1 (Beckman Coulter, США).

Результаты. CD45⁺-инфильтрация отмечена в 50,5 % случаев (30 % – выраженная, 26,4 % – умеренная). CD8⁺-клетки в 21,4 % случаев выраженно инфильтрировали опухоль. В 40 % случаев установлена CD38⁺-инфильтрация. При нелюминальном РМЖ выраженная CD45-инфильтрация отмечалась чаще, чем при люминальном (33 и 26 % соответственно). CD38⁺-инфильтрация выражена при нелюминальном РМЖ ($p = 0,016$). Инфильтрация CD45⁺ положительно коррелировала с ранними стадиями заболевания ($p = 0,071$) и была более выражена при инфильтративно-протоковом, чем при дольковом РМЖ: 59,2 и 20 % соответственно ($p = 0,05$). В костном мозге доля CD45RO⁺-клеток при люминальном РМЖ была больше, чем при нелюминальном: $37,3 \pm 2,3$ и $28 \pm 2,8$ % соответственно, $p = 0,04$. Напротив, доля CD19⁺CD38⁺-клеток была меньше: $24,2 \pm 2$ и $34,8 \pm 6$ %, $p = 0,041$. Интра-туморальные лимфоциты достоверно отрицательно коррелировали с костномозговыми лимфоидными популяциями: CD38⁺-клетки – с NK-клетками; CD4⁺-клетки – с В-предшественниками; CD8⁺-клетки – с В1-лимфоцитами.

Заключение. Лимфоидная инфильтрация РМЖ имеет связь со стадией, размером опухоли, гистологическим видом, биологическим подтипом. Интра-туморальные популяции CD38⁺, CD4⁺, CD3⁺, CD8⁺-клеток находятся в отрицательной корреляционной связи с лимфоидными популяциями костного мозга.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммунофенотипирование, иммунофлюоресценция, криостатные срезы, костный мозг, лимфоидная инфильтрация, костномозговые лимфоциты

Для цитирования: Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Поддубная И.В. и др. Взаимосвязь лимфоидных популяций (инфильтрации) первичной опухоли с иммунными реакциями в костном мозге у больных раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1):49–61. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-49-61

The relationship of lymphoid populations (infiltration) of the primary tumor with bone marrow immune responses in patients with breast cancer

Svetlana V. Chulkova^{1,2}, Elena N. Sholokhova¹, Irina V. Poddubnaya³, Ivan S. Styldi^{1,2}, Angelina V. Egorova², Nikolay A. Kozlov¹, Nikolai N. Tupitsyn¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1a Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barrikadnaya St., 125993 Moscow, Russia

Contacts: Svetlana Vasilievna Chulkova chulkova@mail.ru

Background. Currently, immunotherapy is firmly established in the standard of cancer treatment. The basis for the appointment of immunotherapy are immunological tumor markers, which include lymphoid infiltration, a detailed study of which has received increasing attention in the last decade. An undoubted interest is the study of lymphoid infiltration, not only depending on the morpho-clinical parameters of breast cancer (BC), but also on the immune system of the bone marrow.

Aim. To evaluate the infiltration of the primary tumor by lymphocytes depending on the morpho-clinical characteristics of BC and immune responses in the bone marrow.

Materials and methods. This study included 125 patients with BC who received treatment at the "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of Russia. Tumor stage II was prevailed, a moderate degree of differentiation (G₂) was more often noted. The luminal BC – 67 %, non-luminal – 33 %. Immunophenotyping of the primary tumor: cryostat sections, ZEISS Axioscope luminescent microscope (Zeiss AG, Germany). CD45⁺, CD38⁺, T- and B-cell infiltration were assessed. Bone marrow: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺, CD56⁺ lymphocytes and their subpopulations were studied (FACSCanto II flow cytometer, Kaluza Analysis v2.1 program (Beckman Coulter, USA)).

Results. CD45⁺ infiltration was noted in 50.5 % of cases (severe in 30 %, moderate – 26.4 %). CD8⁺ cells significantly infiltrated the tumor in 21.4 % of cases. CD38⁺ infiltration was observed in 40 %. In the non-luminal BC, severe CD45 infiltration was observed more frequently than in the luminal (33 % vs 26 %). CD38⁺ infiltration is expressed in non-luminal BC ($p = 0.016$). CD45⁺ infiltration was positively correlated with earlier stages ($p = 0.071$) more pronounced in infiltrative ductal BC, than in lobular BC: 59.2 % vs 20 % ($p = 0.05$). The content of CD45RO⁺ cells in bone marrow in the luminal BC is higher than in the non-luminal: 37.3 ± 2.3 % vs 28 ± 2.8 % ($p = 0.04$). The number of CD19⁺CD38⁺ cells, on the contrary, is less: 24.2 ± 2 % vs 34.8 ± 6 % ($p = 0.041$). Tumor-infiltrating lymphocytes highly correlated with bone marrow lymphoid populations: CD38⁺ cells with NK-bone marrow cells; CD4⁺ cells with the B-precursors; CD8⁺ cells with the B1-lymphocytes.

Conclusion. Lymphoid infiltration of BC is associated with stage, tumor size, histological type and biological subtype. Intratumoral populations CD38⁺, CD4⁺, CD3⁺, CD8⁺ cells are in a negative correlation with bone marrow lymphoid populations.

Keywords: breast cancer, immunophenotyping, immunofluorescence, cryostat sections, bone marrow, lymphoid infiltration, bone marrow lymphocytes

For citation: Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Poddubnaya I.V. et al. The relationship of lymphoid populations (infiltration) of the primary tumor with bone marrow immune responses in patients with breast cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(1):49–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-49-61

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является одной из самых распространенных онкопатологий у женщин во всем мире. Заболеваемость РМЖ остается высокой [1]. Показатели смертности от РМЖ за последние годы снизились [2]. Это обусловлено как ранней диагностикой, так и совершенствованием подходов к лекарственной терапии. Вместе с тем лечение РМЖ остается сложной задачей, и еще многие вопросы ждут своего ответа. Хорошо известно, что большинство злокачественных опухолей явля-

ются довольно гетерогенными, что определяет их клиническое течение и выбор персональных лечебных подходов [3–5]. Гетерогенность опухолей обусловлена многими параметрами, включая экспрессию различных онкогенов, разнообразных маркеров клетками первичной и метастатической опухоли – стволовых и адгезионных факторов, рецепторов роста и стероидных гормонов, и др. [6–9]. Наравне с этим важное значение при раке имеет локальный иммунный ответ, изучение которого продолжается по сей день [10].

Фундаментальные исследования в области иммунологии рака в последние десятилетия позволили прояснить ряд механизмов в системе опухоль—иммунитет, благодаря чему стало возможным применение иммуностимулирующих препаратов. Следует отметить, что РМЖ сравнительно долго считался неиммунным по своей природе. Однако на сегодняшний день иммунологические параметры при РМЖ изучаются довольно широко. Инфильтрация опухоли мононуклеарными клетками, а именно лимфоцитами и макрофагами, является, пожалуй, одним из ведущих аспектов, обсуждаемых мировым научным сообществом, поскольку состояние иммунных реакций в значительной степени определяет динамику развития опухоли. Противоопухолевая иммунореактивность складывается из различных клеточных и гуморальных факторов. Клетки как врожденного, так и приобретенного иммунитета, созревание и обучение которых проходит в центральных и периферических лимфоидных органах, участвуют в противоопухолевых иммунных реакциях [11–13]. В совокупности клеточные и гуморальные факторы могут способствовать противоопухолевой защите, с одной стороны, и сдерживать или вовсе подавлять ее, с другой [14]. По данным разных источников, выраженная лимфоидная инфильтрация при РМЖ варьирует от 50 до 70 % [15–17]. Инфильтрирующие опухоль клетки экспрессируют широкий набор Т-, В-, миеломоноцитарных антигенов. Степень выраженности инфильтрации может определяться стадией рака и экспрессией различных рецепторных детерминант [15, 18]. Также отмечено, что интратуморальные иммунные реакции могут быть связаны с эффективностью лекарственного лечения [19, 20]. Например, это соотносится с Т-клеточной реакцией и уровнем активации Т-лимфоцитов, что показано в работе А.В. Субботиной и соавт. [21]. Эти работы и многие другие исследования указывают, что при РМЖ важное значение имеет направленность иммунных реакций [22]. Поэтому немалая доля научных изысканий посвящена изучению роли субпопуляций Т-, В-лимфоцитов в реализации противоопухолевого иммунного ответа. Так, характер интратуморальных иммунных реакций может быть связан с фенотипом опухоли: HLA-DR-негативные опухоли характеризовались сниженным содержанием Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺) [23, 24].

Важным аспектом в изучении взаимодействия опухоли и иммунной системы становятся исследования субпопуляций лимфоцитов в костном мозге, который является не только центральным, но и периферическим лимфоидным органом. Публикаций на этот счет пока немного, но их результаты свидетельствуют о важной роли как основных, так и малых субпопуляций Т-, В-клеток, естественных киллеров

костного мозга в реализации противоопухолевого иммунитета [25, 26]. В ряде работ показано, что в костном мозге увеличено содержание эффекторов противоопухолевого иммунитета, и это, в свою очередь, связано с распространенностью опухоли и ее клинико-морфологическими характеристиками [27–29].

Изучение интратуморальных реакций при РМЖ во взаимосвязи с лимфоидными популяциями костного мозга ранее не проводилось.

Цель данного исследования — изучить интратуморальную инфильтрацию при РМЖ и оценить взаимосвязь между субпопуляциями лимфоцитов костного мозга и первичной опухоли.

Материалы и методы

Материалом для данного исследования послужили образцы опухолевой ткани больных РМЖ. Всего включено в работу 125 больных РМЖ, которые обследованы и получили лечение в условиях ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Возраст больных варьировал от 29 до 79 лет, средний возраст составил $54,4 \pm 0,9$ года. Диагноз РМЖ установлен на основании клинических, рентгенологических и морфологических данных. Всем пациенткам выполнено хирургическое лечение: в объеме мастэктомии — 38 % ($n = 48$), радикальной резекции молочной железы — 62 % ($n = 77$). Все больные получили лекарственную терапию в адъювантном режиме. Лучевая терапия проведена в 36 % случаев ($n = 46$), гормонотерапия — в 72 % ($n = 92$).

Распространенность опухолевого процесса оценивали согласно клинической классификации и международной системе TNM (7-е издание). Распределение больных по стадиям было следующим: I стадия — 27,2 % случаев, IIА стадия — 32,8 %, IIВ стадия — 28,8 %, IIIА — 7,2 %, IIIВ — 1,6 %, IIIС — 2,4 % (табл. 1).

Таблица 1. Распределение больных в зависимости от стадии рака молочной железы

Table 1. Distribution of patients depending on the stage of breast cancer

Стадия Stage	<i>n</i>	%
I	34	27,2
IIА	41	32,8
IIВ	36	28,8
IIIА	9	7,2
IIIВ	2	1,6
IIIС	3	2,4
Всего Total	125	100,0

В большинстве случаев размер первичной опухоли соответствовал категории Т2 (52,8 %, $n = 67$) и Т1 (44,1 %, $n = 56$), в равном числе случаев выявлены стадии Т4 и Т3 (по 1,6 %, $n = 2$). Метастатическое поражение лимфоузлов (N+) наблюдалось в 50 % случаев ($n = 64$): N1 – в 39,4 % ($n = 50$), N2 – в 6,3 % ($n = 8$), N3 – в 4,7 % ($n = 6$). Чаще всего степень дифференцировки опухоли соответствовала G₂ (79,5 %, $n = 101$).

В соответствии с данными патоморфологического исследования в большинстве случаев диагностирован инфильтративно-протоковый РМЖ – 71 % ($n = 89$); инфильтративно-дольковый рак выявлен в 14 % случаев ($n = 17$), другие виды – в 15 % ($n = 19$).

Ввиду ретроспективного характера анализа разделение на молекулярно-биологические подтипы РМЖ нами выполнено на основании экспрессии рецепторов к эстрогенам. Опухоли, экспрессирующие рецепторы к эстрогенам, классифицировали как люминальный РМЖ. При отсутствии экспрессии таковых опухоли относили, соответственно, к нелюминальному подтипу. Таким образом, РМЖ в 67 % случаев ($n = 86$) классифицирован как люминальный, а в 33 % случаев ($n = 41$) – как нелюминальный подтип.

Иммунофенотипирование лимфоидных популяций опухоли и костного мозга выполнено в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России методом иммунофлуоресценции.

Исследование лимфоидных популяций на криостатных срезах опухоли. После приготовления криостатных срезов опухоли их фиксировали на предметных стеклах ацетоном: 10 мин при температуре 4 °С. После фиксации срезы отмывали в среде 199 (рН 7,2–7,4), наносили моноклональные антитела и инкубировали в течение 30 мин. После отмывания наносили FITC-меченные F (ab²) – фрагменты антивидовых IgG1. По окончании инкубации препараты отмывали и консервировали 50 % раствором глицерина. Учет реакции выполняли на люминесцентном микроскопе ZEISS Axioscope (Zeiss AG, Германия). Оценена общелейкоцитарная (CD45), плазмоцитарная (CD38), Т-клеточная (CD3, CD4, CD8) и В-клеточная (CD20) инфильтрация. Моноклональные антитела представлены в табл. 2. Положительными считали клетки, имеющие мембранное свечение разной степени интенсивности (от слабой до выраженной). Выделяли 3 типа реакции:

- 1) практически полное отсутствие лимфоидной инфильтрации, слабая инфильтрация – антигенположительные клетки в срезе не определяются или определяется небольшое их количество в препарате;
- 2) умеренная инфильтрация – умеренное количество антигенположительных клеток в срезе, расположенных разрозненно или отдельными группами;
- 3) выраженная инфильтрация – скопления (очаги) антигенположительных клеток в срезе, могут встречаться крупные группы и инфильтраты из этих клеток.

Таблица 2. Панель моноклональных антител для иммунофенотипирования лимфоцитов и клеток опухоли

Table 2. Monoclonal antibodies for immunophenotyping of lymphocytes and tumor cells

Антитело Antibody	Клон Clone	Флуоресцентная метка Fluorescent label	Производитель Manufacturer
KL-1	—	—	Immunotech, Marseille, Франция Immunotech, Marseille, France
CD45	HI30	—	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD38	HIT2	—	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD3	UCHT1	—	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD4	4B12	—	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD8	HIT8a	—	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD20	2H7	—	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
F (ab ₂) – фрагменты F (ab ₂) – fragments	M1-14D12	FITC	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA

Иммунофенотипирование лимфоцитов костного мозга. Иммунофенотипирование лимфоцитов костного мозга выполнялось с использованием моноклональных антител, меченных напрямую флюорохромами (табл. 3). Костный мозг для исследования был получен при стеральной пункции. После выделения клеток костного мозга клеточную суспензию вносили в пробирки, добавляли антитела и инкубировали в течение 30 мин. Отмывали буферным раствором дважды. Сбор клеток и запись соответствующих файлов проводили на проточном цитометре FACSCanto II (США). Для каждой пробы собирали не менее 100 тыс. событий. Изучены CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD19⁺-, CD16⁺-, CD56⁺-лимфоциты и их субпопуляции. Оценку экспрессии антигенов выполняли с помощью программы Kaluza Analysis v2.1 (Beckman

Coulter, США). Пример цитометрического анализа лимфоцитов костного мозга представлен на рис. 1. Анализ проводился в гейте зрелых лимфоцитов на основании выраженной экспрессии CD45 в сочетании с низкими характеристиками бокового светорассеяния (SSC).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM-SPSS Statistics v. 21. Осуществляли анализ корреляции по Пирсону или Спирмену, подсчет распределения частот по категориям с непрерывными и дискретными переменными (критерий Фишера и χ^2 по Пирсону). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Выполнена оценка выраженности общелейкоцитарной инфильтрации на основании количества

Таблица 3. Моноклональные антитела, использованные при иммунофенотипировании лимфоцитов костного мозга

Table 3. Monoclonal antibodies used in immunophenotyping of bone marrow lymphocytes

Антитело Antibody	Клон Clone	Флуоресцентная метка Fluorescent label	Производитель Manufacturer
CD45	HI30	V500-A, V450, PerCP	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD3	UCHT1	APC	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD4	RPA-T4	V450	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD8	HIT8a	APC-H7	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD19	HIB19	FITC, PE	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD20	2H7	APC-H7	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD16	CB16	FITC, PE	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD56	NCAM16.2	PerCP	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD25	M-A251	V450	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD10	HI10a	FITC	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD38	HIT2	PerCP	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD45RO	UCHL1	V450	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD5	UCHT2	FITC	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
HLA-DR	G46-6	FITC, PE	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA

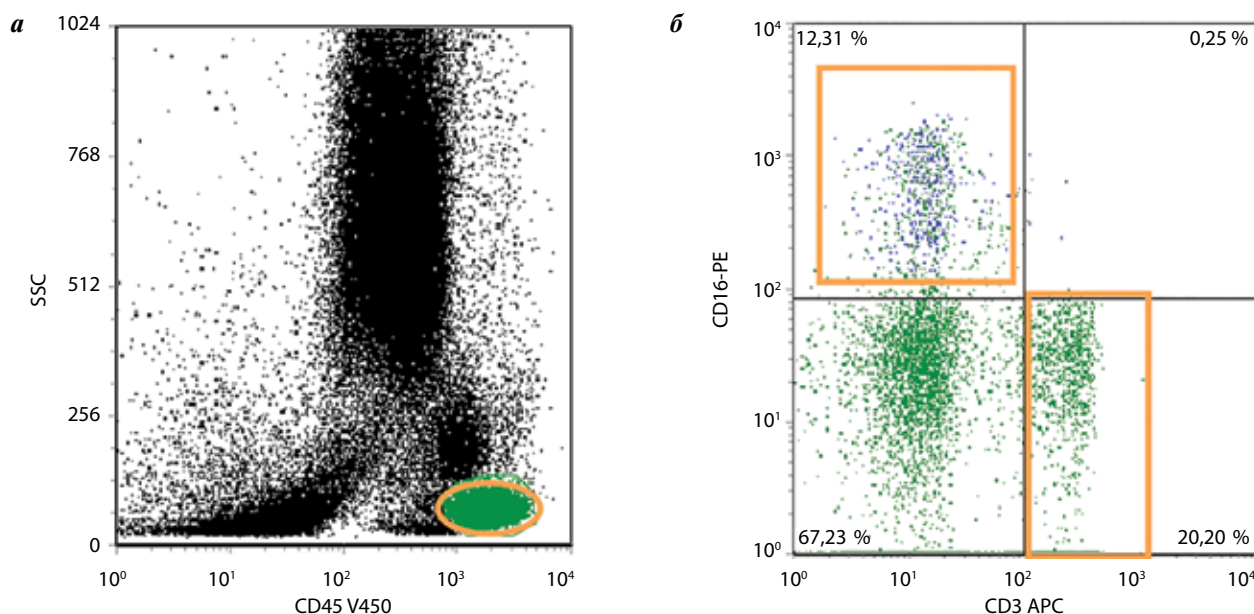


Рис. 1. Пример цитометрического анализа лимфоидных популяций в костном мозге: а – в координатах CD45/SSC выделен гейт лимфоцитов (CD45⁺) (зеленый цвет); б – в гейте лимфоцитов в координатах CD16/CD3 NK-клетки (CD16⁺CD3⁻) составляют 12,3 % (синий цвет), CD3-клетки – 20,2 % (зеленый цвет)

Fig. 1. An example of a cytometric analysis of bone marrow lymphoid populations: a – CD45/SSC coordinates, the lymphocyte gate (CD45⁺) is highlighted in green; б – lymphocyte gate: CD16/CD3 coordinates, NK cells (CD16⁺CD3⁻) – 12,3 % (in blue), CD3 cells – 20,2 % (in green)

CD45⁺-лимфоцитов в опухолевых срезах. Лимфоидная инфильтрация опухоли по группе в целом выявлена в 56,4 % случаев, при этом в 30 % образцов отмечена выраженная степень инфильтрации, а в 26,4 % – умеренная, что хорошо согласуется с результатами других исследователей. Пример выраженной лимфоидной инфильтрации представлен на рис. 2, 3. Т-клеточная инфильтрация была следующей: CD3⁺-клетки инфильтрировали опухоль выражено в 27 % случаев, тогда как 20,0 % образцов демонстрировали умеренную степень инфильтрации. В остальных случаях в опухоли обнаруживались единичные CD3⁺-клетки. Пропорция цитотоксических CD8⁺-клеток в опухоли была незначительной – лишь в 21,4 и 5,7 % наблюдений отмечено выраженное и умеренное их количество соответственно. Немного более выраженной была инфильтрация CD4⁺-клетками, что отмечено в 37 % случаев. CD20⁺-клетки либо отсутствовали, либо незначительно инфильтрировали опухоль. В 40 % образцов наблюдалась слабая и умеренная плазмочитарная (CD38⁺) инфильтрация. Таким образом, полученные нами данные подтверждают, что в осуществлении противоопухолевого иммунного ответа ведущую роль играют Т-клетки.

Далее проанализирована лимфоидная инфильтрация опухоли при биологических подтипах РМЖ. Мы не обнаружили достоверной разницы в степени инфильтрации опухоли CD45⁺-клетками в зависимости от подтипа РМЖ ($p = 0,8$). Однако при нелюми-

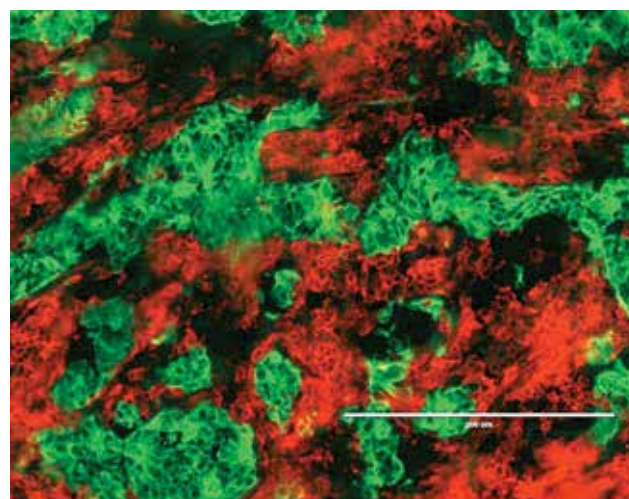


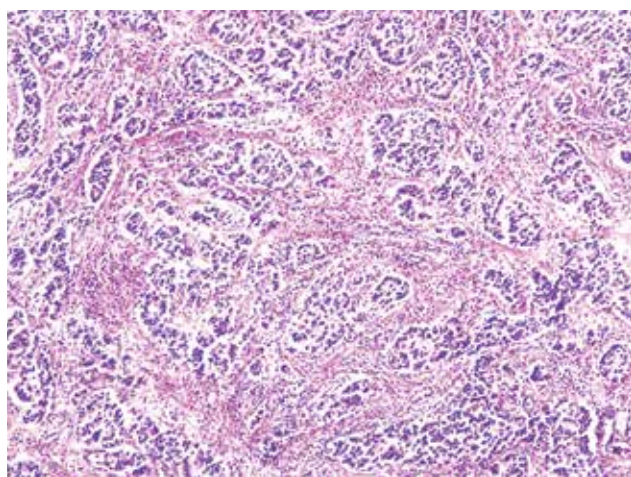
Рис. 2. Инфильтрация опухоли CD45⁺-клетками, выраженная степень ($\times 400$): экспрессия панэпителиального антигена KL-1 клетками рака молочной железы – зеленый цвет, экспрессия панлейкоцитарного антигена CD45 мононуклеарными клетками – красный цвет

Fig. 2. Tumor CD45⁺ infiltration, pronounced degree ($\times 400$): panepithelial antigen KL-1 expression by breast cancer cells – in green, panleukocyte CD45 antigen expression by mononuclear cells – in red

нальном подтипе выраженная CD45-инфильтрация наблюдалась несколько чаще, чем при люминальном (33 % против 26 %, $p = 0,80$) (табл. 4). И действительно, по данным литературы, имеется связь отрицательного рецепторного статуса с более выраженной

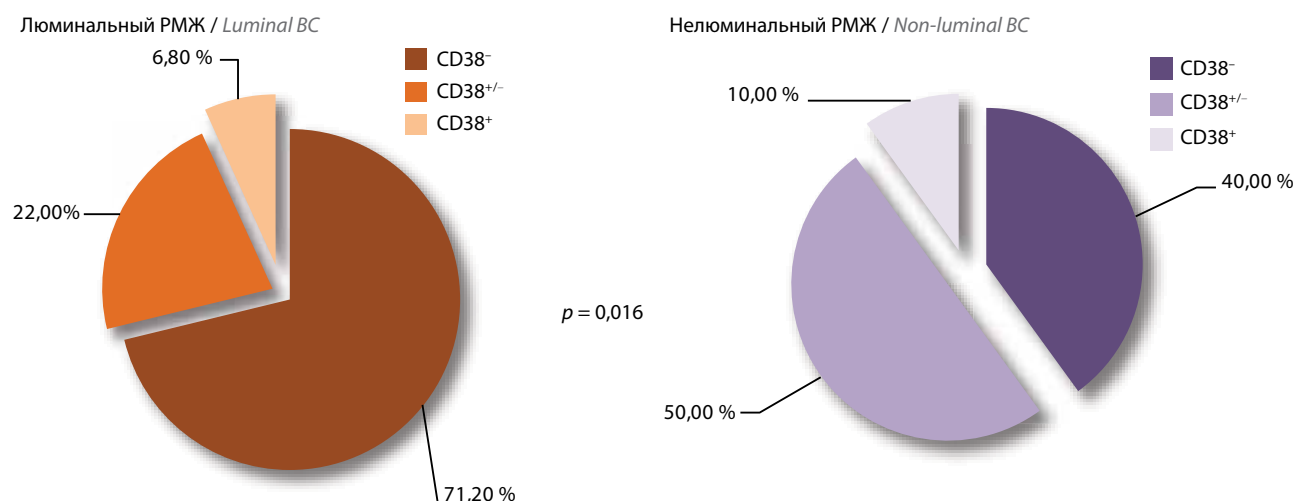
Таблица 4. Инфильтрация CD45⁺-клетками при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы ($p = 0,80$), n (%)Table 4. CD45⁺ cell infiltration in luminal and non-luminal subtypes of breast cancer ($p = 0,80$), n (%)

Подтип рака молочной железы Breast cancer subtypes	Инфильтрация CD45 ⁺ -клетками CD45 ⁺ cell infiltration			Всего Total
	слабая weak	умеренная moderate	выраженная expressed	
Люминальный Luminal	28 (46,7)	16 (26,7)	16 (26,7)	60 (100)
Нелюминальный Non-luminal	13 (43,3)	7 (23,3)	10 (33,3)	30 (100)
Всего Total	41 (45,6)	23 (25,6)	26 (28,9)	90 (100)

Рис. 3. Инвазивный протоковый рак молочной железы. В строме опухоли отмечается высокое содержание опухолинфилирующих лимфоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$ Fig. 3. Invasive ductal breast cancer. The tumor stroma contains a high content of tumor-infiltrating lymphocytes. Hematoxylin and eosin staining, $\times 100$

лимфоидной инфильтрацией [15]. Изучая плазмоцитарную инфильтрацию (CD38⁺), мы установили, что она различалась в зависимости от подтипа РМЖ. При нелюминальном подтипе РМЖ плазмоцитарная инфильтрация была более значительной, что наблюдалось в виде мозаичной реакции в 50,0 % случаев ($n = 15$), тогда как при люминальном – только в 22,0 % ($n = 13$). Признаки были достоверно взаимосвязаны, $p = 0,016$ (рис. 4). Это дополнительно свидетельствует о наличии корреляции рецепторотрицательного статуса с инфильтрацией опухоли плазматическими клетками.

Известно, что выраженная инфильтрация опухоли лимфоцитами наблюдается при тройном негативном РМЖ, который, по последним научным данным, характеризуется более частыми экспрессией PDL-1 и ответом на иммунотерапию [30]. Иной характер иммунных реакций отмечен при люминальном РМЖ, который в сравнении с другими подтипами характеризуется более слабой лимфоидной инфильтрацией

Рис. 4. Инфильтрация CD38⁺-клетками при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы (РМЖ)Fig. 4. CD38⁺ cells infiltration in luminal and non-luminal subtypes of breast cancer (BC)

и, кроме того, низкой экспрессией PD-L1, что ассоциируется с резистентностью к иммунотерапии [22, 31, 32]. Принимая во внимание указанные данные литературы в отношении лимфоидной инфильтрации, мы предполагаем, что в нашей выборке нелюминального подтипа РМЖ, весьма вероятно, присутствовала значительная доля тройного негативного рака, который, как известно, хорошо отвечает на химиотерапию. Здесь уместно отметить, что, по результатам исследований, установлено преимущество лимфоидной инфильтрации в случаях экспрессии клетками рака молекул HLA I класса: при неоадвантантной химиотерапии в таких опухолях чаще наблюдается полный патоморфологический ответ [19].

Следующим шагом стал анализ связи лимфоидной инфильтрации и морфологических параметров опухоли. Установлено, что размеры первичной опухоли (Т-категория) были взаимосвязаны со степенью лимфоидной инфильтрации (CD45⁺) ($p = 0,021$). CD4⁺-, а также CD8⁺-образцы наблюдались достоверно чаще при размерах опухоли, соответствующих Т1. CD4⁺-опухоли при Т1 составили 54,3 % против 18,8 % при Т2. Аналогично для CD8⁺-образцов: 38,9 % и 13,3 %, $p = 0,004$ (табл. 5). Таким образом, инфильтрация опухоли CD3⁺-клетками и их субпопуляциями достоверно отрицательно коррелировала с величиной первичной опухоли.

Таблица 5. CD4⁺-, CD8⁺-инфильтрация в зависимости от размера первичной опухоли (Т), n (%)

Table 5. CD4⁺, CD8⁺ infiltration depending on the size of the primary tumor (T), n (%)

Категория Т T category	CD4-клетки ($p = 0,031$) CD4 cells ($p = 0,031$)		Всего Total
	нет absence	есть presence	
T1	16 (45,7)	19 (54,3)	35 (100)
T2	26 (81,3)	6 (18,8)	32 (100)
T3	2 (100)	0 (0)	2 (100)
	CD8-клетки ($p = 0,004$) CD8 cells ($p = 0,004$)		
T1	22 (61,1)	14 (38,9)	36 (100)
T2	26 (86,7)	4 (13,3)	30 (100)
T3	2 (100)	0 (0)	2 (100)

Также следует отметить, что в целом по мере нарастания интенсивности общего уровня местных иммунных реакций по CD45 доля более ранних стадий РМЖ увеличивалась и, соответственно, уменьшалась доля более поздних стадий ($p = 0,071$) (табл. 6). Эти результаты хорошо согласуются с данными ли-

тературы и более ранних работ нашей лаборатории [18].

Таблица 6. Инфильтрация CD45⁺-клетками при раке молочной железы в зависимости от стадии, n (%)

Table 6. Infiltration of CD45⁺ cells in breast cancer depending on the stage, n (%)

Стадия Stage	CD45 ⁺ -клетки CD45 ⁺ cells		Всего Total
	нет absence	есть presence	
I	5 (25,0)	15 (75,0)	30 (100)
IIA	13 (44,8)	16 (55,2)	29 (100)
IIB	20 (69,0)	9 (31,0)	29 (100)
IIIA	4 (50,0)	4 (50,0)	8 (100)
IIIB	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100)
IIIC	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)
Всего Total	45 (49,5)	46 (50,5)	91 (100)

Установлено, что при инфильтративно-протоковом РМЖ лимфоидная инфильтрация более выражена, чем при дольковом раке. CD45⁺-клетки слабо или умеренно инфильтрировали опухоль суммарно в 59,2 % случаев при протоковом и в 20 % случаев – при дольковом раке. Различия близки к достоверным ($p = 0,05$). Скопления CD3⁺-клеток в опухоли отмечены суммарно в 50,0 % образцов при протоковом раке, тогда как при дольковом – в 12,5 % ($p = 0,065$). CD8⁺-клетки, так же как и CD4⁺-клетки, преобладали при протоковой карциноме в сравнении с дольковым раком (рис. 5). Так, умеренное количество CD4⁺-клеток отмечено в 46 % (23/50) случаев протокового рака и в 18 % (2/11) случаев долькового РМЖ ($p = 0,076$) (табл. 7).

Далее проанализировано среднее содержание различных субпопуляций лимфоцитов костного мозга в зависимости от подтипа РМЖ (t-критерий для независимых выборок). Установлены различия между биологическими подтипами РМЖ (табл. 8). При люминальном подтипе содержание субпопуляций CD45RO⁺ было больше, чем при нелюминальном: средние значения составили $37,3 \pm 2,3$ % против $28 \pm 2,8$ % ($p = 0,04$). В отношении субпопуляции В-лимфоцитов наблюдалась иная картина. Количество CD19⁺CD38⁺-клеток при люминальном подтипе был меньше, чем при нелюминальном: $24,2 \pm 2$ % против $34,8 \pm 6$ % ($p = 0,041$). Привлекла внимание еще одна субпопуляция В-лимфоцитов: В1-клетки врожденного иммунитета (CD5⁺). Количество этих клеток составило $10,4 \pm 2,2$ и $7,7 \pm 1,7$ % при нелю-

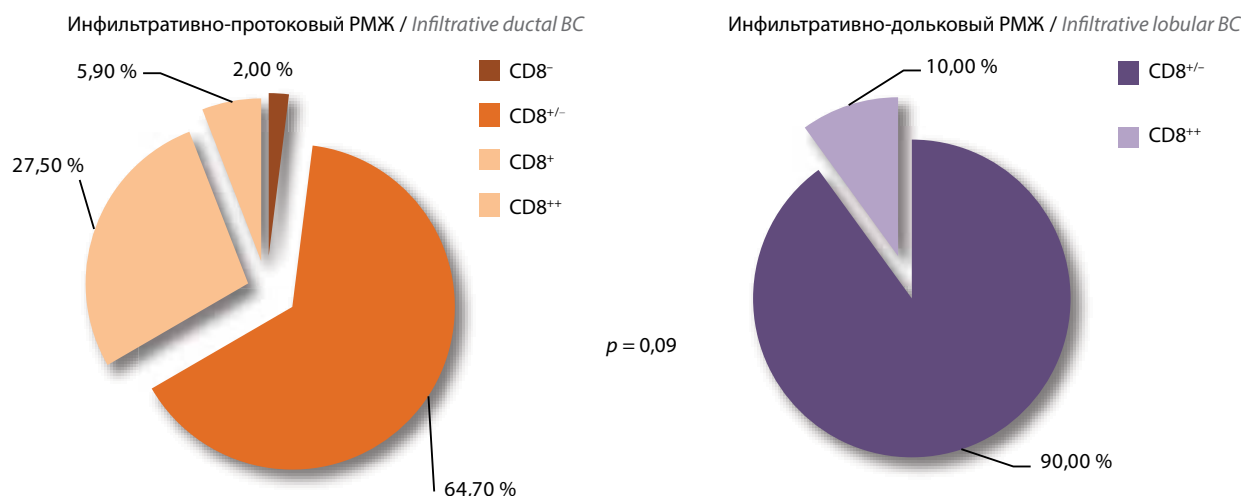


Рис. 5. Инфильтрация $CD8^+$ -клетками при инфильтративно-протоковом и инфильтративно-дольковом раке молочной железы (РМЖ)
Fig. 5. $CD8^+$ cells infiltration in infiltrative ductal and infiltrative lobular breast cancer (BC)

Таблица 7. Инфильтрация $CD4^+$ -клетками при инфильтративно-протоковом и инфильтративно-дольковом раке молочной железы ($p = 0,076$), n (%)

Table 7. $CD4^+$ -cells infiltration in infiltrative ductal and infiltrative lobular breast cancer ($p = 0,076$) n (%)

Гистологический вид рака молочной железы Histological type of breast cancer	CD4 ⁺ -клетки CD4 ⁺ cells		Всего Total
	нет absence	есть presence	
Инфильтративно-протоковый Infiltrative ductal carcinoma	27 (54,0)	23 (46,0)	50 (100)
Инфильтративно-дольковый Infiltrative lobular carcinoma	9 (81,8)	2 (18,2)	11 (100)
Всего Total	36 (59,0)	25 (41,0)	61 (100)

минальном и люминальном подтипах соответственно. Однако количество больных в группе нелюминального рака невелико, и различия не достигли достоверности. Поэтому любые суждения и выводы по данному факту весьма затруднительны и преждевременны. Тем не менее такое совпадение увеличения содержания в костном мозге В-клеток врожденного иммунитета $CD5^+$ и популяции плазматических клеток $CD38^+$ позволяет задуматься о возможном напряжении противоопухолевого иммунного ответа при нелюминальном подтипе. С учетом выраженной лимфоидной инфильтрации это расширяет представления о его особенностях и приближает к пониманию иммунного ответа при данном биологическом подтипе РМЖ. Расшифровка связей между иммунной

системой костного мозга и локальными иммунными процессами в опухоли в дальнейшем может привести к формированию группы больных, селективная иммунотерапия у которых может иметь наибольшую эффективность. Поэтому необходимо накопление материала для уточнения обсуждаемого наблюдения.

При корреляционном анализе показателей лимфоидных популяций костного мозга и степени инфильтрации опухоли лимфоцитами нами выявлены интересные закономерности (табл. 9). Как видно, костномозговые лимфоидные популяции находятся в отрицательной корреляционной связи с интратуморальными лимфоцитами. Это не исключает регуляторного влияния соответствующих клеток с цитотоксическим потенциалом, а также клеток врожденного иммунитета на иммунные интратуморальные реакции. Установлена отрицательная корреляция плазмоцитарной инфильтрации $CD38^+$ с популяциями НК-клеток: $R = -0,455$, $p = 0,044$. Аналогично отрицательная корреляция выявлена в отношении инфильтрирующих опухоль $CD4^+$ -клеток с уровнем В-предшественников: $R = -0,420$, $p = 0,021$. Отрицательная корреляция для $CD8^+$ -клеток выявлена с В1 ($CD5^+$) – лимфоцитами: $R = -0,520$, $p = 0,047$. Также следует отметить корреляционные связи с маргинальной значимостью: отрицательная для $CD3^+$ -, $CD8^+$ -клеток с В-предшественниками ($0,05 < p < 0,1$). Эти факты являются новыми, требуют дальнейшего осмысления и тщательного анализа по мере накопления данных. На наш взгляд, случайность подобного рода ассоциаций, вероятно, может быть исключена. Предпосылкой может служить наблюдение, демонстрирующее выраженную пропорцию НК-клеток в костном мозге больных РМЖ по результатам исследования В.А. Мкртчян и соавт. [32]. Авторы установили, что

Таблица 8. Средние уровни костномозговых популяций лимфоцитов при раке молочной железы

Table 8. Mean levels of bone marrow lymphocyte populations in breast cancer

Популяции лимфоцитов Lymphocyte populations	Биологический подтип Biological subtype	<i>n</i>	<i>M</i> , %	<i>SD</i>	<i>m</i>	<i>p</i>
CD16 ⁺ CD3 ⁻ , CD56 ⁺ CD3 ⁻	Люминальный Luminal	26	11,16	15,087	2,95	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	9	9,23	6,16	2,05	
CD3 ⁺	Люминальный Luminal	39	63,09	11,92	1,90	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	10	61,50	9,84	3,11	
CD45RO ⁺	Люминальный Luminal	40	37,32	14,76	2,33	0,04
	Нелюминальный Non-luminal	12	28,02	9,86	2,84	
CD4 ⁺	Люминальный Luminal	40	39,21	10,25	1,62	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	13	41,29	13,12	3,64	
CD8 ⁺	Люминальный Luminal	40	43,28	12,90	2,04	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	13	42,72	11,75	3,26	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Люминальный Luminal	38	1,02	0,40	0,06	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	13	1,06	0,50	0,14	
CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	Люминальный Luminal	36	9,07	12,42	2,07	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	11	8,83	6,24	1,88	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Люминальный Luminal	35	3,41	2,64	0,44	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	11	3,38	2,47	0,74	
CD19 ⁺	Люминальный Luminal	36	17,32	11,34	1,89	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	10	17,63	6,74	2,13	
CD19 ⁺ CD10 ⁺	Люминальный Luminal	35	15,65	18,03	3,04	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	11	13,98	15,56	4,69	
CD19 ⁺ CD38 ⁺	Люминальный Luminal	39	24,27	12,57	2,01	0,041
	Нелюминальный Non-luminal	12	34,87	22,29	6,43	
CD19 ⁺ CD5 ⁺	Люминальный Luminal	16	7,75	6,95	1,73	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	5	10,46	5,02	2,24	

Примечание. *n* — число пациентов; *M* — среднее значение; *SD* — стандартное отклонение; *m* — стандартная ошибка среднего.
 Note. *n* — number of patients is the quantity; *M* — mean value; *SD* — standard deviation; *m* — standard error of the mean.

Таблица 9. Корреляционные связи костномозговых лимфоцитов с опухолинфильтрирующими лимфоцитами

Table 9. Correlations between bone marrow lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes

Популяции лимфоцитов костного мозга Bone marrow lymphocyte populations	Опухолинфильтрирующие лимфоциты Tumor infiltrating lymphocytes					
	CD45	CD3	CD4	CD8	CD20	CD38
CD16 ⁺ CD3 ⁻ , CD56 ⁺ CD3 ⁻						
R	0,216	0,000	0,045	-0,107	-0,344	-0,455
p	0,347	1,000	0,832	0,636	0,149	0,044
n	21	21	25	22	19	20
CD19 ⁺ CD10 ⁺						
R	-0,153	-0,323	-0,420	-0,340	0,280	-0,089
p	0,437	0,094	0,021	0,077	0,166	0,659
n	28	28	30	28	26	27
CD19 ⁺ CD5 ⁺						
R	-0,271	-0,178	-0,217	-0,520	-0,062	0,023
p	0,309	0,510	0,438	0,047	0,827	0,935
n	16	16	15	15	15	15

более высокие уровни субпопуляций NK-клеток (CD16⁺CD3⁻, CD56⁺CD3⁻) наблюдались при опухолях с низким индексом пролиферативной активности (Ki-67⁺ <20 %). Поэтому целесообразны дальнейшие исследования и, возможно, стоит не ограничиваться основными популяциями лимфоидных клеток, а включить и минорные субпопуляции, которые мало изучены. В недавней работе, посвященной изучению популяций костного мозга больных раком легкого, выявлена связь минорных популяций цитотоксических CD4-лимфоцитов и CD27-лимфоцитов, содержащих перфорин, с гистологическим типом опухоли [29].

Закключение

Лимфоидная инфильтрация при РМЖ наблюдается в 50,5 % случаев, при этом в 30 % образцов — выраженная, а в 26,4 % — умеренная. Доля цитотоксических CD8⁺-клеток в опухоли была незначительной, в 21,4 % наблюдений отмечена выраженная инфильтрация. Немногим больше составляла доля CD4⁺-клеток. При нелюминальном подтипе выраженная степень CD45-инфильтрации наблюдалась несколько чаще, чем при люминальном. В 40 % опухолей отме-

чена плазмодитарная (CD38⁺) инфильтрация, при этом она была более выражена при нелюминальном подтипе. Размер первичной опухоли (индекс Т), стадия, гистологический вид опухоли были взаимосвязаны со степенью лимфоидной инфильтрации. Интенсивность общего уровня местных иммунных реакций по CD45 положительно коррелировала с ранними стадиями. При инфильтративно-протоковом РМЖ лимфоидная инфильтрация более выражена, чем при дольковом раке.

Субпопуляции костномозговых лимфоцитов были связаны с подтипом РМЖ. Содержание CD45RO⁺-клеток при люминальном подтипе было достоверно повышено, тогда как содержание CD19⁺-CD38⁺-клеток — понижено. Имунокомпетентные клетки, инфильтрирующие опухоль, находятся в отрицательной корреляционной связи с костномозговыми лимфоидными популяциями: CD38⁺-клетки — с уровнем NK-клеток костного мозга, CD4⁺-клетки — с уровнем В-предшественников, CD3⁺-, CD8⁺-клетки — с уровнем В-предшественников. Отрицательная корреляция CD8⁺-клеток отмечена с уровнем В1-лимфоцитов CD5⁺.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Global Cancer Statistics 2020. IARC. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>.
- Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. *Int J Cancer* 2021;149:778–89. DOI: 10.1002/ijc.33588
- De Sousa V.M.L., Carvalho L. Heterogeneity in lung cancer. *Pathobiology* 2018;85(1–2):96–107. DOI: 10.1159/000487440
- Чулкова С.В., Маркина И.Г., Антипова А.С. и др. Роль стволовых опухолевых клеток в канцерогенезе и прогнозе меланомы. *Вестник Российского научного центра рентгено-радиологии* 2018;18(4):100–16.
- Chulkova S.V., Markina I.G., Antipova A.S. et al. The role of stem tumor cells in carcinogenesis and the forecast of melanoma. *Vestnik rossiyskogo nauchnogo centra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center for Roentgen Radiology* 2018;18(4):100–16. (In Russ.).
- Chernysheva O., Markina I., Demidov L. et al. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection

- of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. *Cells* 2019;8(6):627. DOI: 10.3390/cells8060627
6. Schüler-Toprak S., Weber F., Skrzypczak M. et al. Expression of estrogen-related receptors in ovarian cancer and impact on survival. *Cancer Res Clin Oncol* 2021;147(9):2555–67. DOI: 10.1007/s00432-021-03673-9
 7. Чулкова С.В. Биомаркеры стволовых клеток желудка. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2018;21(10):11–7. DOI: 10.29296/25877313-2018-10-02 Chulkova S.V. Stomach cancer stem cell biomarkers. *Voprosi biologicheskoy, medicinskoj i farmatsevticheskoy khimii* = Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry 2018;21(10):11–7. (In Russ.). DOI: 10.29296/25877313-2018-10-02
 8. Chang R.B., Beatty G.L. The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance. *J Leukoc Biol* 2020;108(1):363–76. DOI: 10.1002/JLB.3MIR0320-475R
 9. Чулкова С.В., Стилиди И.С., Глухов Е.В. и др. Селезенка – периферический орган иммунной системы. Влияние спленэктомии на иммунный статус. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2014;25(1–2(94)):21–5. Chulkova S.V., Stilidi I.S., Glukhov E.V. et al. The spleen as a peripheral immunity organ. Splenectomy effect on the immunity status. *Vestnik RONC im. N.N. Blohina RAMN* = Journal of N.N. Blokhin Russian Oncology Center 2014; 25(1–2(94)):21–5. (In Russ.).
 10. Gerada Ch., Ryan K.M. Autophagy, the innate immune response and cancer. *Mol Oncol* 2020;14(9):1913–29. DOI: 10.1002/1878-0261.12774
 11. Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Грищенко Н.В. и др. Ключевая роль популяций В1-лимфоцитов в иммунном ответе у больных раком желудка. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(4):64–70. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-64-70 Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Grishchenko N.V. et al. The role of B1 lymphocytes in the antitumor immunity in patients with gastric cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(4):64–70. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-64-70
 12. Huszno J., Nożyńska E.Z., Lange D. et al. The association of tumor lymphocyte infiltration with clinicopathological factors and survival in breast cancer. *Pol J Pathol* 2017;68(1):26–32. DOI: 10.5114/pjp.2017.67612
 13. Li J., Byrne K.T., Yan F. et al. Tumor cell-intrinsic factors underlie heterogeneity of immune cell infiltration and response to immunotherapy. *Immunity* 2018;49:178–93.e7. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.06.006
 14. Gooden M.J.M., De Bock G.H., Leffers N. et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 2011;105(1):93–103. DOI: 10.1038/bjc.2011.189
 15. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Иммунология гемопоза 2009;1(9):8–52. Artamonova E.V. The role of immunophenotyping in the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Immunologiya gemopoeza* = Hematopoiesis Immunology 2009;1(9):8–52. (In Russ.).
 16. De Groot A.F., Blok E.J., Charehbili A. Strong CD8+ lymphocyte infiltration in combination with expression of HLA class I is associated with better tumor control in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2019;175(3):605–15. DOI: 10.1007/s10549-019-05195-y
 17. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Борунова А.И. и др. Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы с результатами лечения. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):25–33. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25-33 Zabolina T.N., Chertkova A.I., Borunova A.A. et al. Relationship of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients with treatment results. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):25–33. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25-33
 18. Субботина А.В., Лetyagin В.П., Тупицын Н.Н. и др. Роль иммунофенотипирования рака молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии. Иммунология гемопоза 2009;1(9):52–79. Subbotina A.V., Letyagin V.P., Tupitsyn N.N. et al. The role of breast cancer immunophenotyping in the process of neoadjuvant chemotherapy. *Immunologiya gemopoeza* = Hematopoiesis Immunology 2009;6(1):52–79. (In Russ.).
 19. Denkert C., Von Minckwitz G., Darb-Esfahani S. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 2018;19(1):40–50. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30904-X
 20. Буров Д.А., Безнос О.А., Воротников И.К. и др. Клиническое значение экспрессии молекул гистосовместимости на клетках рака молочной железы. Иммунология гемопоза 2016;2(14):33–53. Burov D.A., Beznos O.A., Vorotnikov I.K. et al. Clinical significance of histocompatibility molecules expression in breast cancer cells. *Immunologiya gemopoeza* = Hematopoiesis Immunology 2016;2(14):33–53. (In Russ.).
 21. Axelrod M.L., Cook R.S., Johnson D.B. et al. Biological consequences of MHC-II expression by tumor cells in cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25:2392–402. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3200
 22. Горбунова Т.В., Поляков В.Г., Серебрякова И.Н. и др. Сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга у детей при мелкоклеточных саркомах. Иммунология 2012;33(1):37–44. Gorbunova T.V., Polyakov V.G., Serebryakova I.N. et al. Comparative analysis of the subpopulation composition of bone marrow lymphocytes in children with small cell sarcomas. *Immunology* 2012;33(1):37–44. (In Russ.).
 23. Feuerer M., Rocha M., Bai L. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *Int J Cancer* 2001;92(1):96–105.
 24. Рябчиков Д.А., Безнос О.А., Дудина И.А. и др. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):53–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57 Ryabchikov D.A., Beznos O.A., Dudina I.A. et al. Disseminated tumor cells in patients with luminal breast cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):53–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
 25. Solomayer E.F., Feuerer M., Bai L. et al. Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analyzed in the bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(1):174–80.
 26. Тупицын Н.Н., Джуманазаров Т.М., Палладина А.Д. и др. Иммунологические показатели костного мозга больных не-мелкоклеточным раком легкого. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):47–54. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-2-47-54 Tupitsyn N.N., Dzhumanazarov T.M., Palladina A.D. et al. Immunological parameters of bone marrow of patients in non-small cell lung cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(2):47–54. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-2-47-54
 27. Goldberg J., Pastorello R.G., Vallius T. et al. The immunology of hormone receptor positive breast cancer. *Front Immunol* 2021;12:674192. DOI: 10.3389/fimmu.2021.674192

28. Thompson E., Taube J.M., Elwood H. et al. The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. *Mod Pathol* 2016;29(3):249–58. DOI: 10.1038/modpathol.2015.158
29. Sobral-Leite M., Van de Vijver K., Michaut M. et al. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, BRCA1-like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Oncoimmunology* 2018;7(12):e1509820. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1509820
30. Retecki K., Seweryn M., Graczyk-Jarzynka A., Bajor M. The immune landscape of breast cancer: strategies for overcoming immunotherapy resistance. *Cancers (Basel)* 2021;13(23):6012. DOI: 10.3390/cancers13236012
31. Soysal S.D., Tzankov A., Muenst S.E. Role of the tumor microenvironment in breast cancer. *Pathobiology* 2015;82(3–4): 142–152. DOI: 10.1159/000430499
32. Мкртчян В.А., Воротников И.К., Чернышева О.А. и др. Взаимосвязь между НК-клетками костного мозга больных раком молочной железы и биологическими особенностями опухоли и эритропозом. *Онкогинекология* 2019;(3):4–13. Mkrtychyan V.A., Vorotnikov I.K., Chernysheva O.A. et al. Relationship between bone marrow NK cells in breast cancer patients and tumor biological characteristics and erythropoiesis. *Onkoginekologiya = Oncogynecology* 2019;(3):4–3. (In Russ.).

Вклад авторов

С.В. Чулкова: анализ данных, написание текста рукописи, перевод на английский язык, оформление рукописи;
 Е.Н. Шолохова: получение и анализ данных;
 И.В. Поддубная, И.С. Стилиди: анализ рукописи;
 А.В. Егорова: получение и анализ данных, оформление рукописи;
 Н.А. Козлов: получение и анализ данных, анализ рукописи;
 Н.Н. Тупицын: дизайн исследования, анализ данных, анализ рукописи.

Authors' contribution:

S.V. Chulkova: data analysis, manuscript writing, translation into English, manuscript design;
 E.N. Sholokhova: data acquisition and analysis;
 I.V. Poddubnaya, I.S. Stilidi: manuscript analysis;
 A.V. Egorova: data acquisition and analysis, manuscript design;
 N.A. Kozlov: data acquisition and analysis, manuscript analysis;
 N.N. Tupitsyn: study design, data analysis, manuscript analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>
 Е.Н. Шолохова / E.N. Sholokhova: <https://orcid.org/0000-0002-1456-1904>
 И.В. Поддубная / I.V. Poddubnaya: <https://orcid.org/0000-0002-0995-1801>
 И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>
 А.В. Егорова / A.V. Egorova: <https://orcid.org/0000-0003-3904-8530>
 Н.А. Козлов / N.A. Kozlov: <https://orcid.org/0000-0003-3852-3969>
 Н.Н. Тупицын / N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 22.08.2022. Принята к публикации: 05.12.2022.

Article received: 22.08.2022. Accepted for publication: 05.12.2022.